Miltenyi Biotec

Aplikácie systému CliniMACS® Plus

Používateľská príručka



Komponenty systému CliniMACS vrátane činidiel, súprav hadičiek, prístrojov a tlmivého roztoku PBS/EDTA Buffer sú navrhnuté, vyrobené a testované v rámci systému kvality certifikovaného podľa normy ISO 13485. V EÚ sú komponenty systému CliniMACS dostupné na ich príslušný účel použitia ako zdravotnícke pomôcky s pridelenou značkou CE, pokiaľ nie je uvedené inak. V USA je systém CliniMACS CD34 Reagent System vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD34 Reagent, súprav hadičiek CliniMACS Tubing Set TS a CliniMACS Tubing Set LS a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer schválený úradom FDA ako prístroj na humanitárne použitie (Humanitarian Use Device, HUD), povolený federálnym zákonom USA na použitie pri liečbe pacientov s akútnou myeloidnou leukémiou (Acute Myeloid Leukemia, AML) pri prvej úplnej remisii. Účinnosť tohto zariadenia na túto indikáciu nebola preukázaná. Produkty radu CliniMACS sú dostupné iba na základe schválenej žiadosti o povolenie skúšaného nového lieku (Investigational New Drug, IND), výnimky pre skúšanú pomôcku (Investigational Device Exemption, IDE) alebo na základe schválenia úradu FDA. V Austrálii sú nasledujúce komponenty systému CliniMACS Plus zahrnuté v Austrálskom registri terapeutického tovaru (Australian Register of Therapeutic Goods, ARTG), a preto sú schválené na poskytovanie: CliniMACS Plus Instrument, činidlo CliniMACS CD34 Reagent, súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set, súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS, súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set a tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer. V Austrálii sa môžu používať iba tie produkty, ktoré sú zahrnuté v registri ARTG.

Pokiaľ nie je výslovne uvedené inak, produkty a služby spoločnosti Miltenyi Biotec sú určené iba na výskumné účely a nie sú určené na terapeutické ani diagnostické použitie.

Copyright © 2023 Miltenyi Biotec a/alebo jeho pobočky. Všetky práva vyhradené.

Žiadna časť tejto publikácie sa nesmie reprodukovať, ukladať v databázovom systéme, prenášať, publikovať ani distribuovať v akejkoľvek forme ani akýmikoľvek prostriedkami, elektronicky, mechanicky, fotokopírovaním, mikrofilmovaním, nahrávaním ani inak bez predchádzajúceho písomného súhlasu spoločnosti Miltenyi Biotec. Bez ohľadu na vyššie uvedené však platí, že vlastníci systému CliniMACS Plus smú vytvárať kópie výhradne na účely zaškolenia personálu v používaní a údržbe tejto jednotky v rámci svojej firmy alebo organizácie.

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec a MiniMACS sú registrované ochranné známky alebo ochranné známky spoločnosti Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG a/alebo jeho pobočky v rôznych krajinách po celom svete. Všetky ostatné ochranné známky uvedené v tomto dokumente sú majetkom príslušných vlastníkov a používajú sa iba na identifikačné účely.

Aplikácie systému CliniMACS® Plus

Používateľská príručka

Verzia softvéru 2.4x

Dátum vydania: 11/2023
210-003-254/01

MD CE 0123

Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Nemecko

Technická podpora
Miltenyi Biotec Technical Support
+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Základné informácie

Táto používateľská príručka poskytuje informácie o používaní aplikácií systému CliniMACS Plus. Pokyny, varovania, preventívne opatrenia a ďalšie dôležité informácie týkajúce sa používania prístroja CliniMACS Plus Instrument sú uvedené v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument.

⚠ VAROVANIE

Systém CliniMACS Plus smú prevádzkovať výhradne vyškolení operátori. Pred uvedením systému do prevádzky si musíte prečítať a pochopiť bezpečnostné informácie, varovania, preventívne opatrenia a pokyny týkajúce sa správneho prevádzkovania prístroja CliniMACS Plus Instrument uvedené v návode na použitie systému CliniMACS Plus (okrem iného vrátane bezpečnostných informácií uvedených v návode na použitie prístroja CliniMACS Plus Instrument a v kapitole 3 „Varovania a preventívne opatrenia“ na strane 27 tejto používateľskej príručky) a vo všetkých bezpečnostných odporúčaniach vydaných spoločnosťou Miltenyi Biotec. Venujte osobitnú pozornosť všetkým varovaniam zobrazeným na prístroji alebo poskytnutým so spotrebnými materiálmi, príslušenstvom, doplnkovými materiálmi a vybavením. Operátor musí počas prevádzky prístroja vždy dodržiavať všetky bezpečnostné informácie, varovania, preventívne opatrenia a pokyny a ubezpečiť sa, že sú dodržané všetky bezpečnostné informácie, varovania, preventívne opatrenia a pokyny. Nedodržanie bezpečnostných informácií, varovaní, preventívnych opatrení a pokynov uvedených v návode na použitie môže mať za následok poruchu prístroja, poškodenie majetku, stratu cieľových buniek, zranenie osôb a/alebo smrť.

Obsah

1	**Úvod**	**11**
1.1	Všeobecné informácie	11
1.2	Označovanie buniek činidlami CliniMACS	12
1.3	Magnetická separácia buniek s vysokým gradientom	13
1.4	Separačné stratégie	13
1.4.1	Stratégia obohacovania	14
1.4.2	Stratégia ochudobňovania	15
2	**Slovník pojmov**	**19**
2.1	Grafické znázornenie	19
2.2	Slovník symbolov	19
2.3	Slovník pojmov	20
3	**Varovania a preventívne opatrenia**	**27**
3.1	Súvisiace s procesom	27
3.2	Činidlá CliniMACS a biotínové konjugáty	28
3.3	Zaobchádzanie s biologicky nebezpečným materiálom	29
3.4	Bunkový východiskový produkt	30
4	**Systém CliniMACS Plus**	**31**
4.1	CliniMACS Plus Instrument	31
4.2	Činidlá CliniMACS a biotínové konjugáty	31
4.3	Súpravy hadičiek CliniMACS	31
4.4	CliniMACS PBS/EDTA Buffer	31
4.5	Príslušenstvo CliniMACS	32
4.6	Ďalšie potrebné materiály	32
4.7	Potrebné vybavenie	33
5	**Prehľad aplikácií**	**35**
5.1	Four STEPS to your target cells (Štyri KROKY k cieľovým bunkám)	35
5.2	Prehľadová tabuľka	37

6	**Prehľad KROKOV 1 – 4 špecifický pre konkrétne aplikácie**	**41**
6.1	Obohacovanie CD34 pozitívnych buniek	41
6.1.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	41
6.1.2	KROK 2: Výber separačného programu	43
6.1.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	44
6.1.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	44
6.2	Obohacovanie CD14 pozitívnych buniek	44
6.2.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	44
6.2.2	KROK 2: Výber separačného programu	47
6.2.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	47
6.2.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	47
6.3	Obohacovanie/ochudobňovanie činidlom CliniMACS Anti-Biotin Reagent	48
6.3.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	48
6.3.2	KROK 2: Výber separačného programu	52
6.3.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	52
6.3.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	52
6.4	Obohacovanie CD56 pozitívnych buniek	53
6.4.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	53
6.4.2	KROK 2: Výber separačného programu	56
6.4.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	56
6.4.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	56
6.5	Ochudobňovanie CD3 pozitívnych buniek	57
6.5.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	57
6.5.2	KROK 2: Výber separačného programu	61
6.5.3	KROK 3: Inštalácia súpravy hadičiek CliniMACS	61
6.5.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	61
6.6	Ochudobňovanie CD19 pozitívnych buniek	62
6.6.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	62
6.6.2	KROK 2: Výber separačného programu	64
6.6.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	64
6.6.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	65

6.7	Ochudobňovanie CD3 pozitívnych buniek a CD19 pozitívnych buniek	65
6.7.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	65
6.7.2	KROK 2: Výber separačného programu	68
6.7.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	68
6.7.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	68
6.8	Obohacovanie/ochudobňovanie CD8 pozitívnych buniek	69
6.8.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	69
6.8.2	KROK 2: Výber separačného programu	72
6.8.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	72
6.8.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	73
6.9	Obohacovanie/ochudobňovanie CD25 pozitívnych buniek	73
6.9.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	73
6.9.2	KROK 2: Výber separačného programu	78
6.9.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	78
6.9.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	78
6.10	Obohacovanie/ochudobňovanie CD4 pozitívnych buniek	79
6.10.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	79
6.10.2	KROK 2: Výber separačného programu	83
6.10.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	83
6.10.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	83
6.11	Ochudobňovanie CD4 pozitívnych buniek a CD8 pozitívnych buniek	83
6.11.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	84
6.11.2	KROK 2: Výber separačného programu	87
6.11.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	87
6.11.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	88
6.12	Obohacovanie CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek – časť 1: Ochudobňovanie CD19 pozitívnych buniek a označovanie CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek	88
6.12.1	KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie	88
6.12.2	KROK 2: Výber separačného programu	90
6.12.3	KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS	91
6.12.4	KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus	91

6.13 Obohacovanie CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek – časť 2: Flexible Labeling System 92
6.13.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie 92
6.13.2 KROK 2: Výber separačného programu 94
6.13.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS 94
6.13.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus 94
6.14 Obohacovanie CD304 (BDCA-4) pozitívnych buniek 94
6.14.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie 94
6.14.2 KROK 2: Výber separačného programu 97
6.14.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS 97
6.14.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus 97
6.15 Ochudobňovanie TCRα/β pozitívnych buniek 98
6.15.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie 98
6.15.2 KROK 2: Výber separačného programu 101
6.15.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS 101
6.15.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus 102
6.16 Ochudobňovanie CD45RA pozitívnych buniek 102
6.16.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie 102
6.16.2 KROK 2: Výber separačného programu 105
6.16.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS 105
6.16.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus 105
6.17 Obohacovanie ľudských buniek vylučujúcich IFN-gamma pomocou systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) 106
6.17.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie 106
6.17.2 KROK 2: Výber separačného programu 119
6.17.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS 119
6.17.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus 119

7 Podrobné vysvetlenie KROKOV 1 – 4 121

7.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie 121
7.1.1 Prvé vyžadované činnosti 121
7.1.2 Magnetické označovanie buniek 122

7.2 KROK 2: Výber separačného programu 135
7.2.1 Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument 135
7.2.2 CD34 SELECTION 1/2 135
7.2.3 ENRICHMENT 1.1 137
7.2.4 ENRICHMENT 3.2 142
7.2.5 DEPLETION 2.1 144
7.2.6 DEPLETION 3.1 149
7.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS 156
7.3.1 Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS 156
7.3.2 Alternatívna inštalácia súprav hadičiek CliniMACS 171
7.3.3 Súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set 176
7.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus 191
7.4.1 CD34 SELECTION 1/2 191
7.4.2 ENRICHMENT 1.1 195
7.4.3 ENRICHMENT 3.2 199
7.4.4 DEPLETION 2.1 203
7.4.5 DEPLETION 3.1 207

8 Riešenie problémov 211

8.1 Technická podpora Miltenyi Biotec Technical Support 211
8.2 Príprava produktu leukaferézy 211
8.3 Prístroj CliniMACS Plus Instrument a súpravy hadičiek CliniMACS 212
8.3.1 Chybové hlásenia 212
8.3.2 Vloženie a naplnenie súpravy hadičiek 212
8.4 Automatická separácia buniek 213
8.4.1 Varovné hlásenia 213
8.4.2 Neočakávané udalosti: všetky separačné programy 214
8.4.3 Neočakávané udalosti: iba programy obohacovania 216
8.4.4 Neočakávané udalosti: CD34 SELECTION 1/2 217
8.4.5 Neočakávané udalosti: ENRICHMENT 1.1 218
8.4.6 Neočakávané udalosti: ENRICHMENT 3.2 219
8.4.7 Núdzový program (na použitie iba s programami obohacovania) 220
8.4.8 Neočakávané udalosti: DEPLETION 2.1 221
8.4.9 Neočakávané udalosti: DEPLETION 3.1 221

8.5 Účinnosť separácie buniek 224
8.5.1 Neočakávané udalosti: iba programy obohacovania 224
8.5.2 Neočakávané udalosti: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1 226
8.5.3 Neočakávané udalosti: CD34 SELECTION 1/2 226
8.5.4 Neočakávané udalosti: ENRICHMENT 1.1 226
8.5.5 Neočakávané udalosti: DEPLETION 2.1 a DEPLETION 3.1 227

9 Právne poznámky 229
9.1 Obmedzená záruka 229
9.2 Ochranné známky 230

1 Úvod

1.1 Všeobecné informácie

Systém CliniMACS Plus ponúka súpravu nástrojov sprístupňujúcu vysokokvalitné štandardné separácie buniek na terapeutické aplikácie.

Systém CliniMACS Plus je založený na technológii magnetickej separácie buniek (technológia MACS®) vyvinutej spoločnosťou Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG. Spoločnosť Miltenyi Biotec poskytuje tieto produkty na klinické aplikácie spĺňajúce požiadavky európskych regulačných noriem.

Činidlá CliniMACS a biotínové konjugáty sú určené výhradne na použitie *in vitro* a nie sú určené na terapeutické použitie ani na priamu infúziu pacientom.

Činidlá CliniMACS v kombinácii so systémom CliniMACS Plus sú určené na separáciu ľudských buniek.

Spoločnosť Miltenyi Biotec ako výrobca systému CliniMACS Plus neposkytuje žiadne odporúčania týkajúce sa použitia separovaných buniek na terapeutické účely ani žiadne tvrdenia týkajúce sa klinického prínosu.

Pri výrobe a používaní cieľových buniek u ľudí sa musia dodržiavať národné právne predpisy a nariadenia – napr. v prípade EÚ je to smernica 2004/23/ES (ľudské tkanivá a bunky) alebo smernica 2002/98/ES (ľudská krv a zložky krvi). Akákoľvek klinická aplikácia cieľových buniek je preto výlučne v zodpovednosti používateľa systému CliniMACS Plus.

OBMEDZENÁ ZÁRUKA

V prípade použitia systému CliniMACS Plus spôsobom, ktorý nie je výslovne opisovaný v tejto príručke, strácajú platnosť všetky záruky.

DÔLEŽITÉ

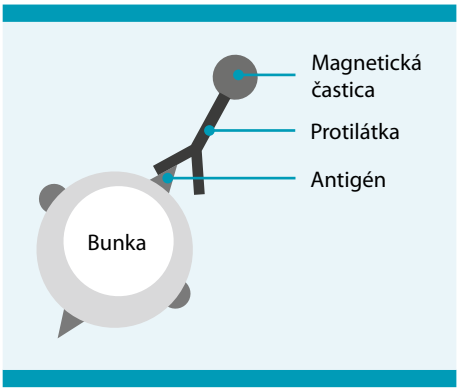
Pred použitím systému CliniMACS Plus alebo akýchkoľvek komponentov mimo územia Európskeho hospodárskeho priestoru je potrebné potvrdiť regulačné schválenie systému CliniMACS Plus alebo akéhokoľvek komponentu systému CliniMACS v príslušnej krajine.

1.2 Označovanie buniek činidlami CliniMACS

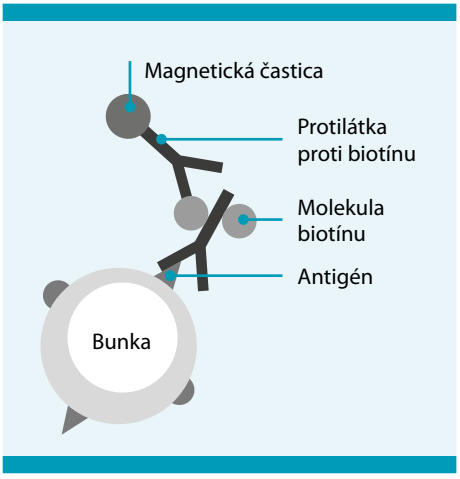
Systém MACS Magnetic Cell Sorting je overený a výkonný nástroj na separáciu rôznych typov buniek vo výskumných laboratóriách, ako aj v klinických aplikáciách. Zmesi buniek sú separované v magnetickom poli za použitia imunomagnetického označenia špecifického pre typ buniek, ktoré sú predmetom záujmu, napr. ľudské CD34 pozitívne krvotvorné progenitórne bunky z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

Pomocou systému CliniMACS Plus sa dajú bunky magneticky označiť tromi rôznymi spôsobmi:

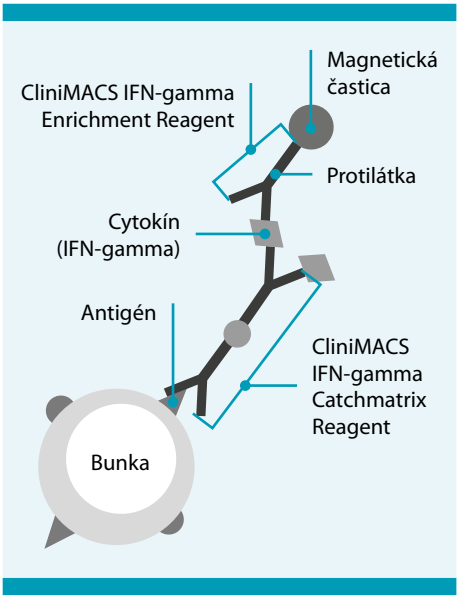
- Priamo pomocou jednokrokového postupu označovania antigénovo-špecifickými protilátkami konjugovanými so superparamagnetickými železo-dextránovými guľôčkami (pozrite si Obrázok 1.1).
- Nepriamo pomocou dvojkrokového postupu označovania nazývaného Flexible Labeling System. V prvom kroku sú bunky označené antigénovo-špecifickými protilátkami konjugovanými s biotínom. V druhom kroku sú tieto protilátky označené protilátkami špecifickými pre biotín konjugovanými so superparamagnetickými železo-dextránovými guľôčkami (pozrite si Obrázok 1.2).
- Nepriamo v dvojkrokovom postupe označovania nazývanom CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma). Bunky sa najprv opätovne stimulujú *in vitro*, aby sa zaistila sekrécia cytokínu (napr. IFN-gamma). V prvom kroku označovania sú opätovne stimulované bunky označené hybridnou molekulou tvorenou protilátkou špecifickou pre leukocyty a protilátkou špecifickou pre cytokín, ktorá sa nazýva činidlo CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Následne sa bunky inkubujú, aby sa umožnila sekrécia cytokínu, ktorý sa „zachytáva“ záchytnou matricou na povrchu buniek. Nasleduje druhý krok označovania, pri ktorom sa bunky vylučujúce cytokín



Obrázok 1.1: Magnetické označovanie buniek



Obrázok 1.2: Flexible Labeling System



Obrázok 1.3: CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

označia protilátkami špecifickými pre cytokín konjugovanými so superparamagnetickými železo-dextránovými guľôčkami (CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent) (pozrite si Obrázok 1.3).

1.3 Magnetická separácia buniek s vysokým gradientom

Suspenzia magneticky označených buniek sa pripojí k prístroju CliniMACS Plus Instrument vybaveného súpravou hadičiek. Jeho jednotka na magnetickú separáciu buniek s vysokým gradientom je tvorená špeciálne vyvinutým výkonným permanentným magnetom a separačným stĺpcom s feromagnetickou matricou.

Pole s vysokým gradientom umožňuje generovať veľké magnetické sily a dosiahnuť rýchlu demagnetizáciu. Keď sa do magnetického poľa umiestnia malé feromagnetické štruktúry, ako napríklad matrica stĺpca, porušia homogenitu poľa. Výsledkom toho je generovanie vysokých magnetických gradientov. V bezprostrednom okolí vytvárajú feromagnetické štruktúry magnetické sily, ktoré sú až 10 000-krát silnejšie než pri konvenčných geometriách. Pole s vysokým gradientom priťahuje k matrici označené bunky a účinne ich zachytáva. Po odstránení stĺpca z magnetu umožní rýchla demagnetizácia matrice stĺpca uvoľnenie zachytených buniek.

1.4 Separačné stratégie

Systém CliniMACS Plus poskytuje používateľovi rôzne separačné programy. Vo všeobecnosti je možné separačné programy rozdeliť na stratégie obohacovania (CD34 SELECTION 1 a 2, ENRICHMENT 1.1 a ENRICHMENT 3.2) a stratégie ochudobňovania (DEPLETION 2.1 a DEPLETION 3.1).

Obohacovanie magneticky označených buniek

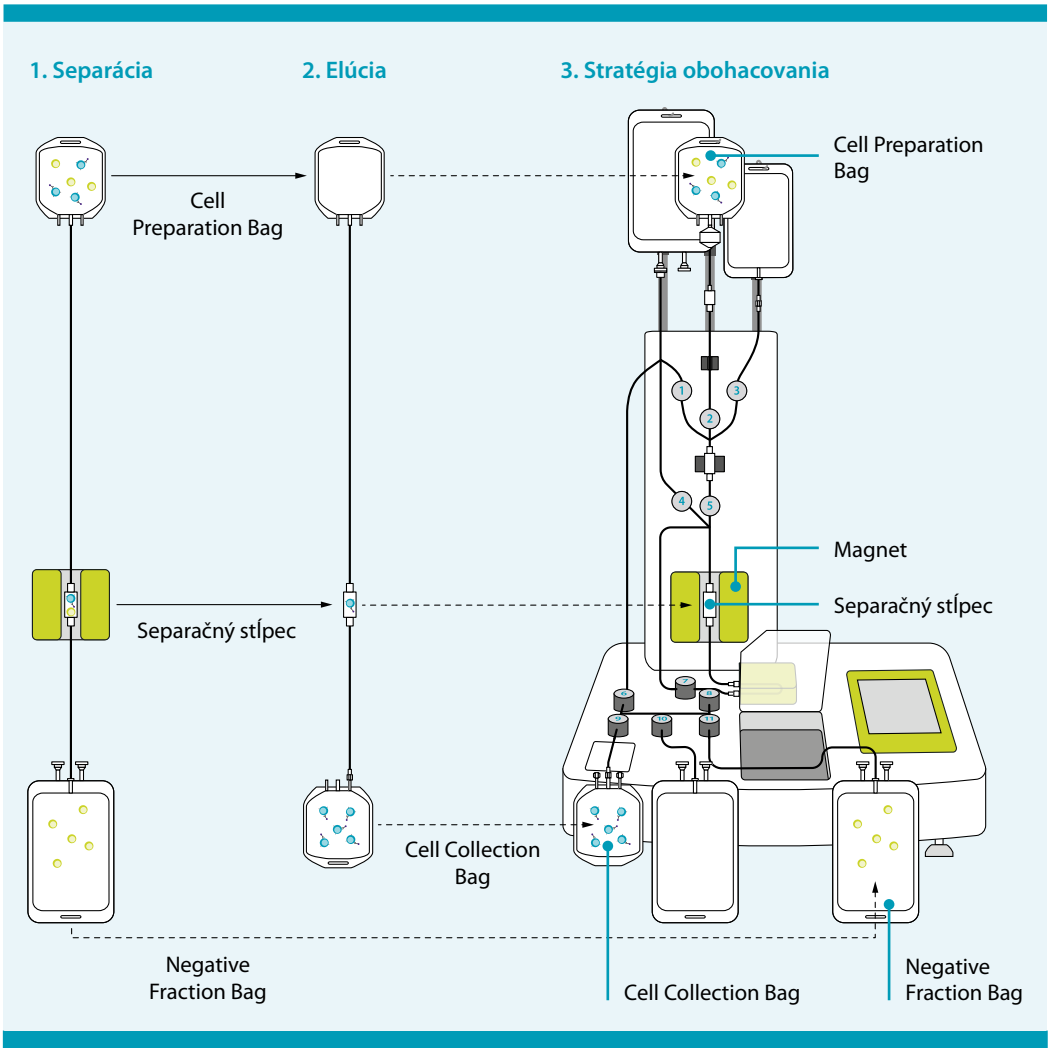
Pri zvolení stratégie obohacovania sú magneticky označené bunky (primárne označené činidlom CliniMACS) zachytávané v separačnom stĺpci a neoznačené bunky prechádzajú ďalej. Označené bunky (cieľové bunky) sa zhromažďujú vo vaku Cell Collection Bag a neoznačené bunky (necieľové bunky) vo vaku Negative Fraction Bag (pozrite si Obrázok 1.4).

Ochudobňovanie magneticky označených buniek

Technológia MACS Technology je veľmi efektívna aj na ochudobňovanie špecifických bunkových populácií. Nežiaduce bunky sú špecificky označené superparamagnetickými časticami a oddelené od cieľových buniek po prechode cez magnetický stĺpec s vysokým gradientom. Oproti stratégii obohacovania sa neoznačené bunky (cieľové bunky) zhromažďujú vo vaku Cell Collection Bag a označené bunky (necieľové bunky) sa zhromažďujú vo vaku Negative Fraction Bag (pozrite si Obrázok 1.5) alebo vo vaku Non-Target Cell Bag (pozrite si Obrázok 1.6 a Obrázok 1.7).

1.4.1 Stratégia obohacovania

Obohacovanie buniek pomocou súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set alebo súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS

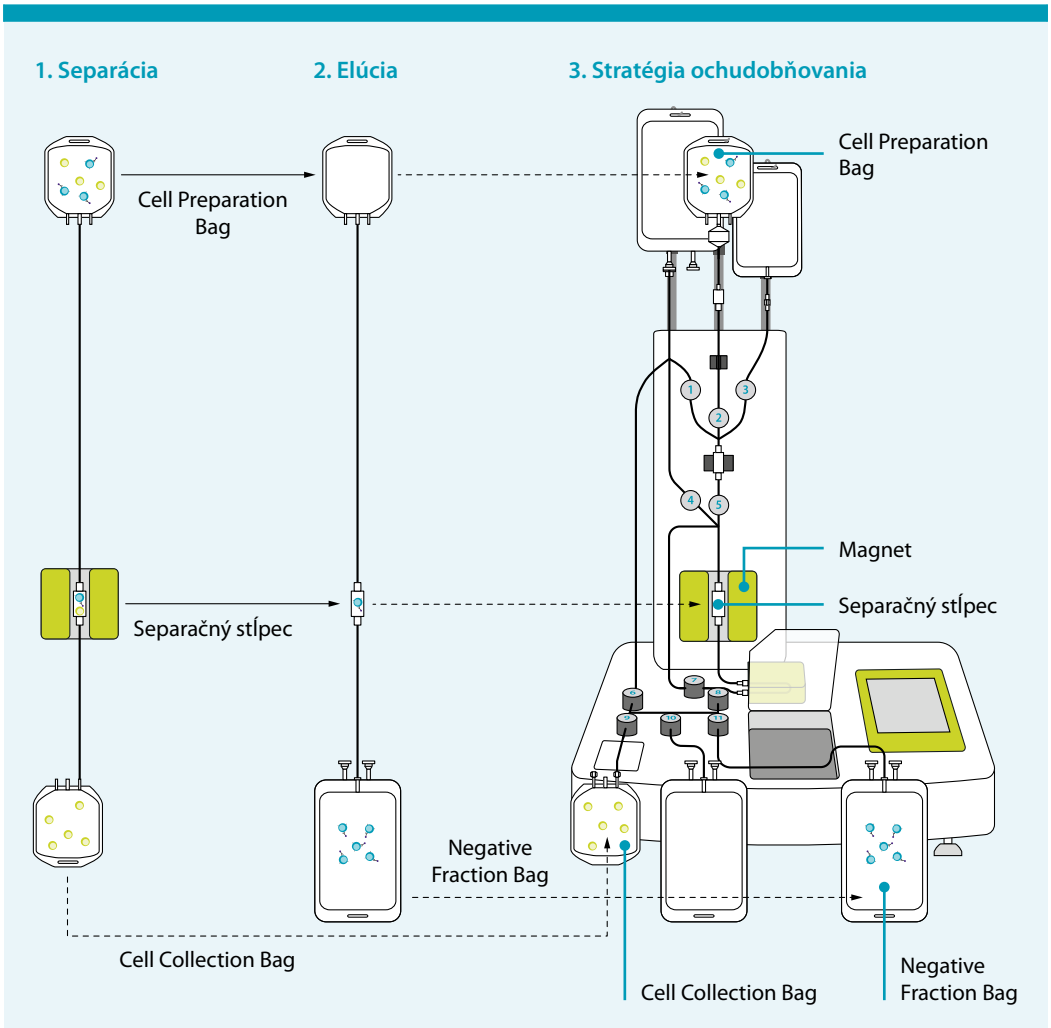


Obrázok 1.4: Stratégia programov obohacovania pomocou súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set alebo súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS

1. Magnet je v polohe „ON“ (zapnuté). Magneticky označené bunky sú zadržiavané v separačnom stĺpci, zatiaľ čo ostatné neoznačené bunky (necieľové bunky) prúdia cez stĺpec a zhromažďujú sa vo vaku Negative Fraction Bag.
2. Magnet je v polohe „OFF“ (vypnuté). Magneticky označené bunky (cieľové bunky) sa uvoľňujú zo separačného stĺpca a zhromažďujú sa vo vaku Cell Collection Bag.
3. Program obohacovania zadržiava magneticky označené bunky v separačnom stĺpci, neoznačené bunky (necieľové bunky) prúdia cez stĺpec a zhromažďujú sa vo vaku Negative Fraction Bag. Keď sa magnet presunie do polohy „OFF“ (vypnuté), magneticky označené bunky (cieľové bunky) sa uvoľnia zo stĺpca a zhromažďujú sa vo vaku Cell Collection Bag. **Poznámka:** Frakcia cieľových buniek sa vždy zhromažďuje vo vaku Cell Collection Bag.

1.4.2 Stratégia ochudobňovania

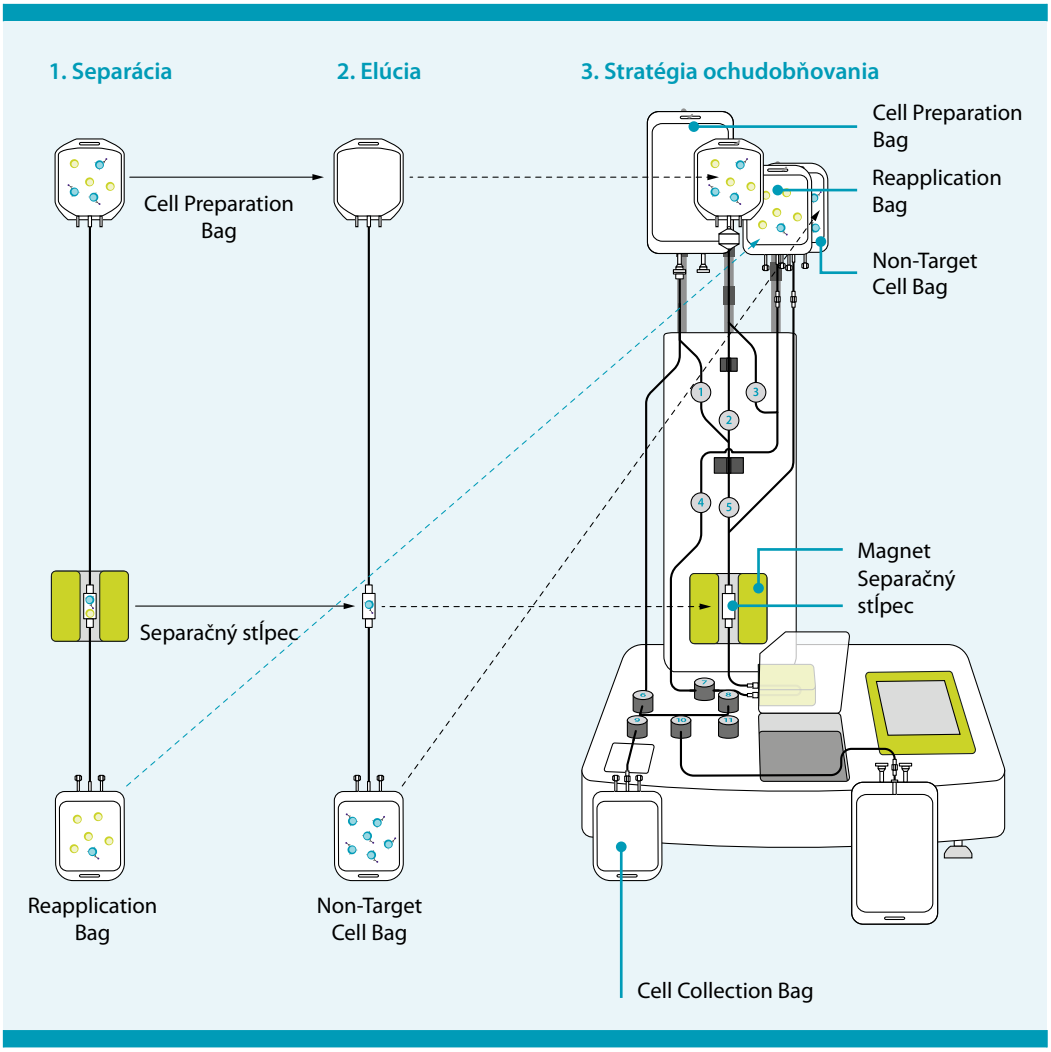
Ochudobňovanie buniek pomocou súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS: DEPLETION 2.1



Obrázok 1.5: Stratégia programu ochudobňovania DEPLETION 2.1 pomocou súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS

1. Magnet je v polohe „ON“ (zapnuté). Magneticky označené bunky sú zadržiavané v separačnom stĺpci, zatiaľ čo ostatné neoznačené bunky (cieľové bunky) prúdia cez stĺpec a zhromažďujú sa vo vaku Cell Collection Bag.
2. Magnet je v polohe „OFF“ (vypnuté). Magneticky označené bunky (necieľové bunky) sa uvoľňujú zo separačného stĺpca a zhromažďujú sa vo vaku Negative Fraction Bag.
3. Program ochudobňovania (DEPLETION 2.1) zachytáva magneticky označené bunky v separačnom stĺpci, neoznačené bunky (cieľové bunky) prúdia cez stĺpec a zhromažďujú sa vo vaku Cell Collection Bag. Keď sa magnet presunie do polohy „OFF“ (vypnuté), magneticky označené bunky (necieľové bunky) sa uvoľnia zo stĺpca a zhromažďujú sa vo vaku Negative Fraction Bag. **Poznámka:** Frakcia cieľových buniek sa vždy zhromažďuje vo vaku Cell Collection Bag.

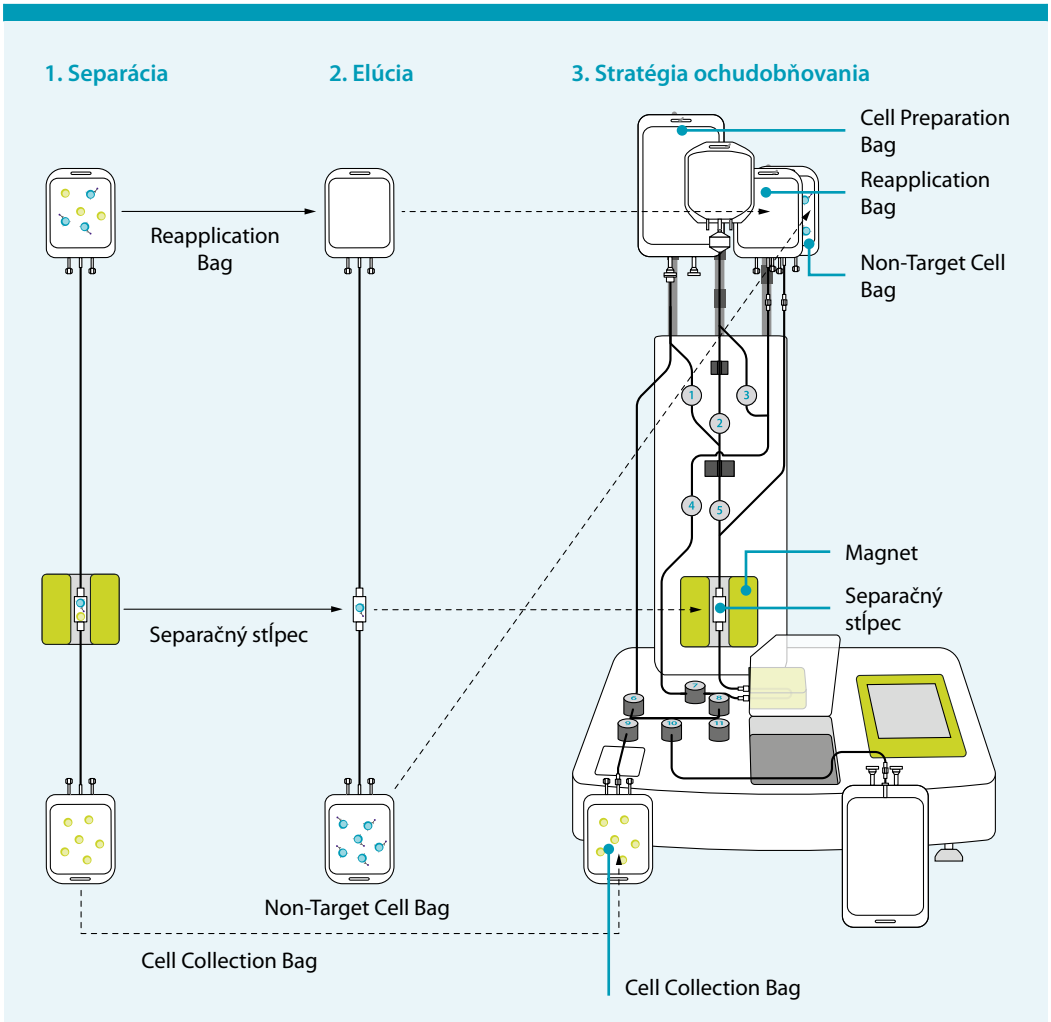
Ochudobňovanie buniek pomocou súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Part 1: Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage])



Obrázok 1.6: Stratégia programu ochudobňovania DEPLETION 3.1 pomocou súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (Part 1)

1. Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage): Magnet je v polohe „ON“ (zapnuté). Magneticky označené bunky sú zadržiavané v separačnom stĺpci, zatiaľ čo ostatné neoznačené bunky (cieľové bunky) prúdia cez stĺpec a zhromažďujú sa vo vaku Reapplication Bag.
2. Magnet je v polohe „OFF“ (vypnuté). Magneticky označené bunky (necieľové bunky) sa uvoľňujú zo separačného stĺpca a zhromažďujú sa vo vaku Non-Target Cell Bag.
3. Program ochudobňovania (DEPLETION 3.1) zadržiava magneticky označené bunky v separačnom stĺpci, neoznačené bunky (cieľové bunky) prúdia cez stĺpec a zhromažďujú sa vo vaku Reapplication Bag, aby sa mohli znova naložiť do separačného stĺpca pri druhom senzitívnom ochudobňovaní (pozrite si Obrázok 1.7). Keď sa magnet presunie do polohy „OFF“ (vypnuté), magneticky označené bunky (necieľové bunky) sa uvoľnia zo stĺpca a zhromažďujú sa vo vaku Non-Target Cell Bag.

Ochudobňovanie buniek pomocou súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set: DEPLETION 3.1 (Part 2: Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage])



Obrázok 1.7: Stratégia programu ochudobňovania DEPLETION 3.1 pomocou súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (Part 2)

4. Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage): Magnet je v polohe „ON“ (zapnuté). Bunky z vaku Reapplication Bag sa opäť naložia do separačného stĺpca. Niekoľko zvyšných magneticky označených buniek sa zadrží v separačnom stĺpci, zatiaľ čo ostatné neoznačené bunky (cieľové bunky) prúdia cez stĺpec a zhromažďujú sa vo vaku Cell Collection Bag.
5. Magnet je v polohe „OFF“ (vypnuté). Magneticky označené bunky (necieľové bunky) sa uvoľňujú zo separačného stĺpca a zhromažďujú sa vo vaku Non-Target Cell Bag.
6. Na konci separácie sú označené bunky (necieľové bunky) vo vaku Non-Target Cell Bag a neoznačené bunky (cieľové bunky) sú vo vaku Cell Collection Bag. **Poznámka:** Frakcia cieľových buniek sa vždy zhromažďuje vo vaku Cell Collection Bag.

2 Slovník pojmov

2.1 Grafické znázornenie

Nasledujúca schéma znázorňuje panely používané v tejto používateľskej príručke na informovanie používateľa o možných rizikách, ak nebudú dodržané uvedené varovania a preventívne opatrenia. Úroveň nebezpečnosti klasifikuje nebezpečenstvo, ako sa to opisuje nižšie. Úroveň, typ a zdroj nebezpečenstva, ako aj možné následky, zákazy a opatrenia sa uvádzajú nasledovne. Ikony na ľavej strane špecifikujú riziko.

⚠ VAROVANIE

Indikuje nebezpečnú situáciu, ktorá by mohla mať za následok smrť alebo závažné zranenie, ak sa jej nezabráni

⚠ UPOZORNENIE

Indikuje nebezpečnú situáciu, ktorá by mohla mať za následok nezávažné alebo stredne závažné zranenie, ak sa jej nezabráni

POZNÁMKA

Indikuje informácie, ktoré sú považované za dôležité, ale nesúvisia s nebezpečenstvom (napr. hlásenia týkajúce sa poškodenia majetku)

DÔLEŽITÉ

Upozorňuje používateľa na dôležité postupy alebo informácie, ktoré nesúvisia so zranením osôb ani s poškodením majetku

2.2 Slovník symbolov

Prehľad symbolov používaných pre systém CliniMACS Plus je uvedený v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument. Slovník symbolov uvádza symboly používané v používateľských príručkách a na označeniach produktov CliniMACS.

2.3 Slovník pojmov

Aferéza	Metóda odberu krvi, pri ktorej sa odoberie plná krv, separuje sa a uchová sa požadovaná zložka a zvyšná krv sa vráti darcovi.
Antigén TCRα/β	TCRα/β je heterodimér receptora T buniek tvorený dvoma transmembránovými glykoproteínovými reťazcami, α a β. Oba reťazce sú členmi nadrodiny Ig a pozostávajú z konštantnej a polymorfnej variabilnej oblasti. Variabilná oblasť TCRα/β je zapojená do rozpoznávania antigénnych peptidov prezentovaných MHC komplexom buniek prezentujúcich antigén. Antigén TCRα/β sa exprimuje na väčšine T buniek periférnej krvi.
Antigén CD14	Antigén CD14 je 53 – 55 kD glykoproteín bunkových membrán exprimovaný na monocytoch. Antigén CD14 je známy tiež ako receptor pre komplex LPS a väzbového proteínu LPS (LBP).
Antigén CD19	Antigén CD19 je kritická signálna transdukčná molekula, ktorá reguluje vývoj, aktiváciu a diferenciáciu B lymfocytov. Ako marker línie B buniek sa CD19 exprimuje od skorého štádia pro-B buniek až po štádium lymfoblastu B buniek, ale expresia je regulovaná smerom nadol po dozrievaní B buniek na plazmatické bunky. Antigén CD19 sa ďalej exprimuje na väčšine malígnych B buniek a na podskupine folikulárnych dendritických buniek.
Antigén CD1c (BDCA-1)	CD1c je súčasťou klastra génov CD1, o ktorom sa predpokladá, že súvisí s MHC. Gény CD1 sú zoskupené v klastri v oblasti s dĺžkou 170 000 bp ľudského chromozómu 1q23.1. Proteíny, ktoré sú ním kódované (CD1a-e), sa exprimujú ako heterodiméry pozostávajúce z ťažkého reťazca CD1 nekovalentne spárovaného s mikroglobulínom ß2. CD1c sa podieľa na antigénovej prezentácii mikrobiálnych glykolipidov alebo lipopeptidových antigénov voči T lymfocytom. V ľudskej periférnej krvi sa CD1c (BDCA-1) exprimuje na myeloidných dendritických bunkách typu-1 (MDC1) a na podskupine B lymfocytov. Možno ich nájsť v lymfatických uzlinách, plášťových zónach a zárodočných centrách, v okrajovej zóne sleziny a v periférnej krvi plodu a dospelých osôb.
Antigén CD25	Antigén CD25, alfa reťazec receptora interleukínu-2 s nízkou afinitou (IL-2Rα), sa exprimuje na aktivovaných T a B bunkách, NK bunkách a monocytoch, rovnako ako aj na regulačných CD4 pozitívnych T bunkách. Antigén CD25 vykazuje tri epitopové oblasti A, B a C. Protilátka činidla CliniMACS CD25 Reagent rozpoznáva epitop A molekuly CD25.

Antigén CD3	Antigén CD3 sa nachádza na zrelých ľudských T bunkách, tymocytoch a podskupine NK buniek. Je asociovaný s T bunkovým receptorom (TCR) a zodpovedá za transdukciu signálu TCR. Antigén CD3 je tvorený komplexom piatich nemenných reťazcov: γ, δ, ε, ζ a η. Protilátka CD3 rozpoznáva všetky T bunky, t. j. reaguje so 70 – 80 % ľudských lymfocytov v periférnej krvi a so 65 – 85 % tymocytov. Epitop rozpoznávaný protilátkou je umiestnený na ε-reťazci komplexu CD3.
Antigén CD304 (BDCA-4)	Antigén CD304 (BDCA-4) je 130 – 140 kDa bunkový povrchový glykoproteín exprimovaný v čerstvej krvi a kostnej dreni výlučne na plazmacytoidných dendritických bunkách.
Antigén CD34	Antigén CD34 je vysoko glykozylovaný 115 kDa integrálny membránový proteín typu 1 s neznámou funkciou, ktorý sa exprimuje na 1 % až 4 % normálnych buniek kostnej drene a menej ako 0,2 % normálnych leukocytov v periférnej krvi, na podskupinách stromálnych buniek kostnej drene a na endoteli malých ciev rozličných tkanív.
Antigén CD4	Antigén CD4 sa exprimuje na väčšine tymocytov a približne na dvoch tretinách T buniek v periférnej krvi; exprimuje sa tiež na monocytoch a makrofágoch. CD4 je prídavná molekula pri rozpoznávaní cudzích antigénov v súvislosti s MHC triedy II. CD4 je navyše receptorom pre HIV-1.
Antigén CD45RA	Antigén CD45RA sa exprimuje na naivných CD4 a CD8 pozitívnych T bunkách, rovnako ako aj na podskupinách B buniek, NK buniek a monocytov. Ide o izoformu bežného leukocytového antigénu CD45, transmembránovej proteín tyrozínfosfatázy.
Antigén CD56	Antigén CD56 je členom rodiny NCAM (rodina molekúl adhézie neurálnych buniek), ktorá sa exprimuje v krvotvornom systéme na NK, NKT bunkách.
Antigén CD8	Antigén CD8 je dimér s disulfidovou väzbou, ktorý sa vyskytuje buď ako CD8 α homodimér, alebo ako CD8 α/β heterodimér. CD8 sa silno exprimuje na CD8 pozitívnych T bunkách a tymocytoch a na podskupine NK buniek a CD8 pozitívnych γ/δ T buniek. Pri rozpoznávaní antigénu pôsobí CD8 ako koreceptor s receptormi T buniek obmedzenými na MHC triedy I.
Armatúra v tvare T	Armatúra v tvare T na súprave hadičiek, kde sa stýkajú tri hadičky
BDCA	Antigén krvných dendritických buniek
Bezpečnostný spínač pumpy	Snímač, ktorý zabraňuje prevádzke pumpy, keď sú otvorené dvierka pumpy

Buffer Waste Bag	Odpadový vak na zhromažďovanie tlmivého roztoku počas separácie buniek pomocou prístroja CliniMACS Plus Instrument
Bunkový východiskový produkt	Produkt obsahujúci bunky, používaný ako východiskový materiál pre proces CliniMACS Plus Separation, napr. leukaferézny zber, PBMC alebo kostná dreň
Cell Collection Bag	Vak, v ktorom sa po separácii zhromažďujú purifikované cieľové bunky
Cell Preparation Bag	Vak, do ktorého sa prenáša bunkový produkt a v ktorom prebieha magnetické označovanie a premývanie buniek
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek primárne označených biotinylovanými protilátkami alebo ligandmi.
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	Kombinácia činidiel pozostávajúca z činidla CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent a činidla CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Pomocou systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) je možné obohacovať bunky vylučujúce IFN-gamma po opätovnej stimulácii *in vitro*.
CliniMACS Depletion Tubing Set	Súprava hadičiek, konektorov, stĺpcov a vakov, pomocou ktorej sa spracúva magneticky označená bunková suspenzia a v ktorej prebieha magnetická separácia buniek, špeciálne navrhnutá pre špecifické potreby ochudobňovania
CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent	Súčasť systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) na povrchové označovanie leukocytov IFN-gamma špecifickými protilátkami
CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent	Súčasť systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) na magnetické označovanie IFN-gamma naviazaného na činidlo CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent na bunkách vylučujúcich IFN-gamma
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Tlmivý roztok používaný na prípravu a separáciu buniek pomocou systému CliniMACS Plus: PBS (fyziologický roztok pufrovaný fosfátmi), doplnený o 1 mM EDTA, pH 7,2. Pred použitím sa musí tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer zmiešať s HSA farmaceutickej triedy na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotnostná/objemová koncentrácia, t. j. 5 g HSA na liter tlmivého roztoku).
CliniMACS Plus Instrument	Prístroj na magnetickú separáciu buniek založený na technológii MACS Technology

CliniMACS TCRα/β-Biotin	Biotinylovaná protilátka na označovanie ľudských buniek exprimujúcich antigén TCRα/β pred magnetickým označením pomocou činidla CliniMACS Anti-Biotin Reagent
CliniMACS Tubing Set, CliniMACS Tubing Set LS	Súprava hadičiek, konektorov, stĺpcov a vakov, pomocou ktorej sa spracúva magneticky označená bunková suspenzia a v ktorej prebieha magnetická separácia buniek
CliniMACS CD14 Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD14
CliniMACS CD19 Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD19
CliniMACS CD1c Biotin (BDCA-1)	Biotinylovaná protilátka na označovanie ľudských buniek exprimujúcich antigén CD1c (BDCA-1) pred magnetickým označovaním pomocou činidla CliniMACS Anti-Biotin Reagent.
CliniMACS CD25 Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD25
CliniMACS CD3 Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD3
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD304 (BDCA-4)
CliniMACS CD34 Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD34
CliniMACS CD4 Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD4
CliniMACS CD45RA Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD45RA
CliniMACS CD56 Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD56
CliniMACS CD8 Reagent	Činidlo na magnetické označovanie buniek exprimujúcich antigén CD8
Držiak predradeného stĺpca	Podpera namontovaná na prístroji CliniMACS Plus Instrument, ktorá pridŕža predradený stĺpec na mieste
Držiak separačného stĺpca	Lisované vodiace lišty v magnetovom puzdre, ktoré drží separačný stĺpec na svojom mieste
EDTA	Kyselina etyléndiamín-tetraoctová

Držiak výberového stĺpca	Pozrite si držiak separačného stĺpca.
Extraktor plazmy	Pomôcka používaná na extrakciu kvapaliny z vaku Cell Preparation Bag po premytí buniek
HSA	Ľudský sérový albumín
IgG	Imunoglobulín G
Konektor typu luer	Skrutková spojka, súčasť súpravy hadičiek
Krvotvorné progenitórne bunky	Progenitórne bunky lymfoidných, myeloidných a erytroidných línií
Leukaferéza	Aferézny zber leukocytov
Luer/Spike Interconnector	Prenosová súprava s prepichovacím kolíkom (hrotom) a adaptérom pre injekčnú striekačku (zásuvkový konektor luer) na plazmu alebo tekutiny
MDC	Myeloidné dendritické bunky
Magnetická protilátka	Superparamagneticky označená protilátka
Monoklonálne protilátky	Jediný typ protilátky, ktorá pôsobí proti špecifickému epitopu (antigén, antigénny determinant) a je produkovaná jedným klonom B buniek alebo jednou hybridómovou bunkovou líniou, ktorá je tvorená fúziou lymfocytovej bunky s myelómovou bunkou. Niektoré myelómové bunky prirodzene syntetizujú jednotlivé protilátky.
Napĺňanie	Krok pred separáciou buniek, pri ktorom sa cez súpravu hadičiek prepláchne tlmivý roztok
Negative Fraction Bag	Vak súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS obsahujúci frakciu necieľových buniek.
Non-Target Cell Bag	Vak súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set obsahujúci frakciu necieľových buniek
Orbitálny rotátor	Pomôcka používaná na miešanie bunkového produktu počas reakcie s činidlami CliniMACS
Označovanie	Reakcia buniek s magnetickým označovacím činidlom, napr. CD34 pozitívnych buniek s činidlom CliniMACS CD34 Reagent
PBMC	Mononukleárna bunka periférnej krvi

Peristaltická pumpa	Hadičková pumpa používaná v prístroji CliniMACS Plus Instrument na reguláciu rýchlosti prietoku tekutiny v súprave hadičiek
Plasma Waste Bag	Odpadový vak na zber prebytočnej plazmy pred postupom označovania
Postup vo vnútri vaku	Sterilné spracovanie a prenos buniek v uzavretom prostredí transferových vakov
Pre-System Filter	40 µm filtračné zariadenie medzi vakom Cell Preparation Bag a predradeným stĺpcom, ktoré slúži na zachytávanie zhlukov a zvyškov buniek
Predradený stĺpec	Prvý stĺpec v súpravách hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS, ktorý slúži ako filter na zachytávanie buniek s nešpecifickými interakciami s matricou stĺpca
Priehradka na vaky	Priehradka prístroja CliniMACS Plus Instrument, do ktorej sa umiestňujú vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag
Priming Waste Bag	Vak, v ktorom sa zhromažďuje tlmivý roztok z kroku napĺňania
Protilátka proti biotínu	Táto protilátka rozpoznáva bunky, ktoré boli predtým označené príslušnou biotinylovanou protilátkou alebo ligandom.
Reapplication Bag	Vak súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set, v ktorom sa počas separácie dočasne zhromažďujú neoznačené bunky. Neoznačené bunky z vaku Reapplication Bag sa cez separačný stĺpec prevádzajú dvakrát, aby sa zaručila vysoká čistota cieľových buniek.
Separačné činidlo	Činidlo na magnetické označovanie buniek, napr. CliniMACS CD34 Reagent
Separačný program	Softvérový program určený na obohacovanie alebo ochudobňovanie magneticky označených bunkových podskupín zo zmiešanej bunkovej populácie. Vyberte si z ponuky separačných programov v závislosti od požadovanej separácie.
Separačný stĺpec	Stĺpec, v ktorom sa separujú magneticky označené bunky pri ich vystavení magnetickému poľu
Snímač kvapaliny	Súčasť prístroja CliniMACS Plus Instrument, ktorá deteguje kvapalinu v hadičkách
Spojka miesta odberu vzoriek	Injekčný port, napr. na odber vzoriek alebo pridávanie činidiel CliniMACS do vaku Cell Preparation Bag

Súprava na prenos plazmy	Prenosová súprava s dvomi prepichovacími kolíkmi (hrotmi) na plazmu alebo tekutiny
Tepelný zatavovač	Tepelné zariadenie používané na sterilné zatavovanie hadičiek z PVC
Transferový vak	Vak s hadičkami a hrotom na konci
Upínací krúžok	Súčasť súpravy hadičiek, ktorá umožňuje zotrvanie hadičiek pumpy na správnom mieste
Vešiak na vaky	Držiak na prístroji CliniMACS Plus Instrument na pripevnenie vakov Cell Preparation Bag, Non-Target Cell Bag, Priming Waste Bag, Reapplication Bag a vaku na tlmivý roztok
Výberový stĺpec	Pozrite si separačný stĺpec.
Výberový tlmivý roztok	Pozrite si tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer.
WBC	Biele krvinky
Wash Waste Bag	Zberný vak, do ktorého sa zhromažďuje premývací supernatant separáciou od sedimentovanej bunkovej suspenzie po krokoch odstreďovania počas prípravy vzorky
ot./min	Počet otáčok za minútu
× g	Násobky gravitačného zrýchlenia Zeme
Ľudský sérový albumín	HSA farmaceutickej triedy schválený v krajine používateľa je potrebný ako prídavný tlmivý roztok pri použití so systémom CliniMACS Plus.

3 Varovania a preventívne opatrenia

Táto kapitola vysvetľuje potenciálne riziká spojené s prevádzkou systému CliniMACS Plus. Vždy je potrebné dodržiavať miestne pokyny týkajúce sa bezpečnosti práce, zásady, normy týkajúce sa správnej výrobnej praxe, zdravia, bezpečnosti a prevencie nehôd. Pokyny na použitie, ako napríklad varovania a preventívne opatrenia týkajúce sa manipulácie s biologicky nebezpečnými materiálmi a bunkovým východiskovým produktom, ako aj komponentmi systému CliniMACS Plus, nájdete v príslušných častiach v návode na použitie príslušného komponentu. Podrobné pokyny na použitie prístroja CliniMACS Plus Instrument sa opisujú v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument.

Akákoľvek závažná udalosť, ktorá sa vyskytne v súvislosti s týmto produktom, sa musí nahlásiť spoločnosti Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG – pomocou poskytnutých kontaktných údajov – a príslušnému orgánu členského štátu, v ktorom sídli používateľ tohto produktu.

3.1 Súvisiace s procesom

⚠ VAROVANIE

Existuje riziko zlyhania procesu alebo poškodenia prístroja. Pri vykonávaní postupov nevyškolenými operátormi existuje riziko zlyhania procesu alebo poškodenia prístroja. Všetky postupy spracovania musia vykonávať výhradne vyškolení operátori. Školenie operátorov poskytne kvalifikovaný zástupca spoločnosti Miltenyi Biotec.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nižšej účinnosti procesu. Teploty nižšie alebo vyššie než izbová teplota môžu mať za následok nižšiu životaschopnosť, čistotu a výťažnosť cieľových buniek. Prípravu vzoriek a separáciu buniek vykonávajte pri izbovej teplote (+19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

⚠ UPOZORNENIE

Môže byť ohrozená bezpečnosť zariadení. Ak sa prístroj nepoužíva podľa pokynov výrobcu, môže byť ohrozená bezpečnosť zariadení. Dôkladne si prečítajte a pochopte bezpečnostné informácie, varovania, preventívne opatrenia a pokyny týkajúce sa správneho prevádzkovania systému CliniMACS Plus uvedené v návode na použitie systému CliniMACS Plus a vo všetkých bezpečnostných odporúčaniach vydaných spoločnosťou Miltenyi Biotec.

- Pri výrobe a používaní cieľových buniek u ľudí sa musia dodržiavať národné právne predpisy a nariadenia – napr. v prípade EÚ je to smernica 2004/23/ES (ľudské tkanivá a bunky) alebo smernica 2002/98/ES (ľudská krv a zložky krvi). Akákoľvek klinická aplikácia cieľových buniek je preto výlučne v zodpovednosti používateľa systému CliniMACS Plus.

- So všetkými materiálmi, ktoré prišli do styku s krvou a krvnými produktami, sa musí zaobchádzať ako s infekčným materiálom. Musia sa dodržiavať predpisy upravujúce zaobchádzanie s infekčnými materiálmi.
- Všetky hadičky, armatúry, ventily, predradený stĺpec a separačný stĺpec treba počas procesu napĺňania dôkladne kontrolovať, či nedochádza k únikom.
- Všetky vaky vrátane vakov použitých pri príprave vzorky treba uchovávať až do dokončenia finálnej analýzy odobratých buniek a potvrdenia úspešnej separácie cieľových buniek.

3.2 Činidlá CliniMACS a biotínové konjugáty

- Keď sa pacientom podá infúzia alebo injekcia frakcie cieľových buniek, môžu sa im do tela dostať stopové množstvá myšacej protilátky a komplexu železa a dextránu.
- Guľôčky z komplexu železa a dextránu a/alebo myšacie protilátky môžu u pacientov spôsobiť alergické alebo anafylaktické reakcie. Je potrebné mať k dispozícii vybavenie a lieky na zabezpečenie intenzívnej starostlivosti.
- Separáciu buniek pomocou činidiel CliniMACS and biotínových konjugátov musí vykonávať výhradne vyškolený personál.
- Operátori používajúci činidlá CliniMACS a biotínové konjugáty Biotin Conjugate by mali mať skúsenosti so separáciou buniek z kostnej drene alebo periférnej krvi.
- Necieľové bunky nie sú určené na terapeutické použitie a nesmú sa pacientom podávať opätovnou infúziou.
- Činidlá CliniMACS a biotínové konjugáty Biotin Conjugate sú určené výhradne na použitie *in vitro* a nie sú určené na terapeutické použitie ani na priamu infúziu pacientom.
- Činidlá CliniMACS a biotínové konjugáty Biotin Conjugate sa neodporúčajú používať u pacientov, u ktorých je známa citlivosť alebo existuje podozrenie na citlivosť voči myším imunoglobulínom alebo komplexu železa a dextránu.
- U pacientov sa môžu vytvoriť ľudské protimyšacie protilátky (HAMA).
- Nepoužívajte po dátume najneskoršej spotreby vytlačenom na označení produktu.
- Nepoužívajte, ak je poškodený obal. Činidlá používajte iba v prípade, ak je liekovka nepoškodená a zatavená.

3.3 Zaobchádzanie s biologicky nebezpečným materiálom

⚠ VAROVANIE

Riziko závažného zranenia alebo smrti. V závislosti od použitého biologického materiálu môže kontakt viesť k závažnému zraneniu osôb alebo smrti. Vždy noste osobné ochranné prostriedky v súlade s varovaniami a preventívnymi opatreniami, najmä ak je alebo bol použitý biologicky nebezpečný materiál.

- Všetky prípravné kroky treba vykonávať v sterilných podmienkach použitím aseptických postupov (napr. v digestore s laminárnym prúdením), aby sa zabránilo kontaminácii bunkového východiskového produktu.
- Operátor vykonávajúci separáciu buniek musí byť vyškolený v správnom používaní zariadenia a zaobchádzaní s krvnými produktmi a aspirátom kostnej drene.
- Operátor vykonávajúci separáciu buniek by mal pri práci so vzorkami pacientov a pri zaobchádzaní s potenciálne biologicky nebezpečným materiálom nosiť vhodný odev (napr. laboratórny plášť, rukavice a ochranné štíty alebo okuliare).
- So všetkými krvnými produktmi sa musí zaobchádzať ako s potenciálnym biologickým nebezpečenstvom. S produktom leukaferézy, krvným produktom, aspirátom kostnej drene, odobratými bunkami, použitým tlmivým roztokom, použitou súpravou hadičiek a inými materiálmi, ktoré boli v kontakte s týmito tekutinami, sa musí zaobchádzať ako s biologicky nebezpečnými materiálmi v súlade so štandardnými nemocničnými alebo inštitucionálnymi požiadavkami.
- Prístroj CliniMACS Plus Instrument treba po každej vykonanej separácii považovať za potenciálne biologické nebezpečenstvo a vyčistiť ho vodným roztokom biocídneho čistiaceho prostriedku (napr. Bacillol® plus alebo Meliseptol®, pozrite si tiež časť „Čistenie a údržba“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument) v súlade so štandardnými nemocničnými alebo inštitucionálnymi požiadavkami.
- S jednorazovými materiálmi sa musí zaobchádzať ako s biologicky nebezpečnými materiálmi v súlade so štandardnými nemocničnými alebo inštitucionálnymi požiadavkami.

3.4 Bunkový východiskový produkt

DÔLEŽITÉ

Označovanie a separáciu buniek treba začať čo najskôr po odobratí bunkového východiskového produktu. Pri začatí postupu označovania a separácie by produkt nemal byť starší než 24 hodín.

- Bunkový východiskový produkt (napr. produkt leukaferézy) treba odoberať v súlade so štandardnými nemocničnými alebo inštitucionálnymi postupmi do štandardných odberových vakov.
- Nádoba obsahujúca bunkový východiskový produkt by mala byť označená identifikačnými údajmi pacienta, časom, dátumom a miestom odberu v súlade s postupmi špecifikovanými na použitie s klinickým protokolom.
- Pred prepravou treba bunkový východiskový produkt zabaliť v izolovaných nádobách a uchovávať pri regulovanej izbovej teplote (+19 až +25 °C [+66 až +77 °F]) v súlade so štandardnými nemocničnými alebo inštitucionálnymi postupmi odberu krvi schválenými na použitie s klinickým protokolom. Neuchovávajte v chladničke. Koncentrácia buniek by počas prepravy nemala prekročiť $0,2\times10^9$ buniek na mL.
- Vyhýbajte sa intenzívnemu miešaniu bunkového východiskového materiálu.
- Ak sa bunkový východiskový produkt musí skladovať, napríklad cez noc, treba ho uchovávať pri regulovanej izbovej teplote (+19 až +25 °C [+66 až +77 °F]). Počas skladovania by koncentrácia leukocytov nikdy nemala presiahnuť $0,2\times10^9$ buniek na mL.
- Bunky treba skladovať v autológnej plazme. Ak je koncentrácia buniek vyššia než $0,2\times10^9$ buniek na mL, zrieďte bunkový východiskový produkt autológnou plazmou.

4 Systém CliniMACS Plus

Systém CliniMACS Plus pozostávajúci z prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidiel CliniMACS, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set, tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer a ďalšieho príslušenstva, ktoré sa musí používať v kombinácii, je určený na *in vitro* separáciu špecifických ľudských buniek na klinické použitie.

DÔLEŽITÉ
Pokyny na použitie, ako napríklad varovania a preventívne opatrenia týkajúce sa komponentov systému CliniMACS Plus, nájdete v návode na použitie dodanom s príslušným komponentom.

4.1 CliniMACS Plus Instrument

Prístroj CliniMACS Plus Instrument je elektromechanické zariadenie obsahujúci permanentný magnet, peristaltickú pumpu, škrtiace ventily, elektroniku a softvér.

4.2 Činidlá CliniMACS a biotínové konjugáty

Činidlá CliniMACS sú tmavo sfarbené, neviskózne, koloidné roztoky obsahujúce konjugáty bunkovo špecifických protilátok v tlmivom roztoku. Tieto činidlá pozostávajú z protilátky chemicky viazanej na superparamagnetické častice.

Biotínové konjugáty CliniMACS sú číre a bezfarebné roztoky obsahujúce protilátku kovalentne naviazanú na biotín v tlmivom roztoku. Tieto protilátky sú vysoko špecifické, čo umožňuje *in vitro* označovanie cieľových buniek s veľmi nízkymi koncentráciami.

4.3 Súpravy hadičiek CliniMACS

Súpravy hadičiek CliniMACS sú sterilné, jednorazovo použiteľné súpravy určené na použitie v kombinácii s prístrojom CliniMACS Plus Instrument na *in vitro* obohacovanie alebo ochudobňovanie ľudských buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

4.4 CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer je premývacia a transportná tekutina, ktorá umožňuje *in vitro* separáciu ľudských buniek.

4.5 Príslušenstvo CliniMACS

- **súprava na prenos plazmy:**
  prenosová súprava Transfer Set Coupler/Coupler (REF 200-073-902) s dvomi hrotmi na plazmu alebo tekutiny alebo ekvivalentný produkt
- **Luer/Spike Interconnector:**
  prenosová súprava Luer/Spike Interconnector (REF 200-073-903) s hrotom a adaptérom na injekčnú striekačku (zásuvkový konektor luer) na plazmu alebo tekutiny alebo ekvivalentný produkt

4.6 Ďalšie potrebné materiály

Okrem produktov CliniMACS môžu byť na separáciu pomocou systému CliniMACS Plus potrebné ďalšie materiály:

- **vaky na bunkovú kultúru, priepustné pre plyn:**
  vak MACS GMP Cell Differentiation Bag – 100 mL (REF 170-076-400) alebo ekvivalentný produkt
- **transferové vaky vhodné na odstreďovanie:**
  150 mL transferový vak Terumo alebo ekvivalentný produkt
  600 mL transferový vak Terumo alebo ekvivalentný produkt
  1 000 mL transferový vak Terumo alebo ekvivalentný produkt
- **spojka miesta odberu vzoriek:**
  spojka miesta odberu vzoriek Terumo alebo ekvivalentný produkt
- **Pre-System Filter:**
  filter na transfúziu krvi Haemonetics® alebo ekvivalentný produkt
- **injekčné striekačky a ihly:**
  vhodné injekčné striekačky (5 mL, 10 mL, 20 mL, 50 mL) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- **zaisťovacie kliešte**
- **skúmavky na vzorky**
- **ľudský sérový albumín (HSA):**
  Používajte výlučne HSA farmaceutickej kvality, ktorý je v krajine používateľa k dispozícii ako schválený produkt.
- **imunoglobulín G na klinické použitie:**
  Používajte výlučne IgG farmaceutickej kvality, ktorý je v krajine používateľa, napr. v Nemecku, k dispozícii ako schválený liek: Gamunex® 10 % alebo ekvivalentný produkt.
- **bunkové kultivačné médium:**
  napr. RPMI 1640 alebo ekvivalentný produkt
- **materiály špecifické pre aplikáciu:**
  individuálna biotinylovaná bunková špecifická protilátka alebo ligand, AB sérum alebo alternatívne autológne sérum

4.7 Potrebné vybavenie

- **zdroj neprerušiteľného napájania:**
  odporúčaný zdroj neprerušiteľného napájania (UPS): APC Smart-UPS 1 500 VA, 230 V s USB a sériovým rozhraním od výrobcu APC (American Power Conversion) alebo ekvivalentný produkt
- **digestor s laminárnym prúdením**
- **sterilný hadičkový konektor:**
  sterilné pripájacie zariadenie Terumo (TSCD®) alebo ekvivalentný produkt
- **orbitálny rotátor:**
  plošinové trepačky Heidolph Instruments alebo ekvivalentný produkt
- **odstredivka:**
  odstredivka Sorvall alebo ekvivalentný produkt a nádoby na odstreďovanie s aerosólovými uzávermi
- **extraktor plazmy:**
  lis na separáciu plazmy Terumo Equipment alebo ekvivalentný produkt
- **stolová váha:**
  laboratórna váha Mettler Toledo alebo ekvivalentný produkt s kapacitou 1 kg a rozlíšením 0,1 g
- **tepelný zatavovač hadičiek:**
  ručný zatavovač Baxter Hematron III alebo ekvivalentný produkt
- **vytláčačka hadičiek:**
  vytláčačka obsahu hadičiek Baxter alebo ekvivalentný produkt
- **nádoby na biologicky nebezpečný odpad**

Ďalšie vybavenie potrebné pre systém CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma):

- 24-jamková kultivačná nádobka Sigma Aldrich Corning™ Costar™ 24 well culture plate alebo ekvivalentný produkt
- MiniMACS™ Separation Unit, Miltenyi Biotec (REF 130-042-102)
- MS Columns, Miltenyi Biotec (REF 130-042-201)
- Pre-Separation Filter, Miltenyi Biotec (REF 130-041-407)
- MACSmix™ Tube Rotator, Miltenyi Biotec (REF 130-090-753)

5 Prehľad aplikácií

5.1 Four STEPS to your target cells (Štyri KROKY k cieľovým bunkám)

V nasledujúcej kapitole je uvedený prehľad týkajúci sa separácie buniek pomocou systému CliniMACS Plus. Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus prebieha v štyroch KROKOCH. V prvom kroku sa bunky pripravia a magneticky označia. V druhom kroku sa zvolí vhodný separačný program. V treťom kroku sa na prístroj CliniMACS Plus Instrument nainštaluje súprava hadičiek a vo štvrtom kroku sa automaticky separujú bunky.

Môže sa vyžadovať zaznamenávanie údajov o procese súvisiacich s danou aplikáciou. Pre podporné pracovné hárky kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Používateľská príručka k aplikáciám systému CliniMACS Plus obsahuje rôzne možnosti pre jednotlivé kroky (rôzne činidlá, súpravy hadičiek a programy). Pred začatím aplikácie je potrebné zvoliť kapitoly špecifické pre danú aplikáciu (kapitola 6) a podrobné vysvetlenie KROKOV 1 – 4 (kapitola 7) pomocou prehľadovej tabuľky začínajúcej na nasledujúcej strane. Prehľadová tabuľka obsahuje informácie o príslušných častiach používateľskej príručky. Prehľadová tabuľka vychádza z typu a počtu činidiel, počtu buniek, typu súpravy hadičiek a príslušného separačného programu potrebného na separáciu.

KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

KROK 1 opisuje prípravu bunkového produktu a magnetické označovanie špecifických buniek exprimujúcich príslušný antigén. Postupujte podľa pokynov uvedených v príslušnej časti. Pokračujte KROKOM 2.

KROK 2: Výber separačného programu

KROK 2 opisuje výber separačného programu prístroja CliniMACS Plus Instrument. V závislosti od typu a počtu buniek, ktoré sa majú separovať, je potrebné vybrať rôzne programy. Na určenie toho, ktorý program sa použije, prejdite na prehľadovú tabuľku na nasledujúcej strane. Prečítajte si príslušnú časť pre vybratý separačný program. Postupujte podľa pokynov uvedených v príslušnej časti. Pokračujte KROKOM 3.

KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

KROK 3 vysvetľuje postup inštalácie súpravy hadičiek na prístroj CliniMACS Plus Instrument. Postupujte podľa pokynov uvedených v príslušnej časti. Pokračujte KROKOM 4.

KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

KROK 4 opisuje automatickú separáciu buniek pomocou systému CliniMACS Plus. Prístroj CliniMACS Plus Instrument vykonáva postup automatickej separácie buniek (zvolený v KROKU 2). Postupujte podľa pokynov uvedených v príslušnej časti.

DÔLEŽITÉ

Prehľadová tabuľka na nasledujúcich stranách sumarizuje informácie o typických aplikáciách činidiel CliniMACS. Ak je potrebné vykonať separáciu iného počtu cieľových buniek, pozrite si pokyny uvedené v prehľade špecifickom pre konkrétnu aplikáciu, kde sa nachádzajú informácie o maximálnej kapacite príslušnej aplikácie. Postupujte podľa pokynov uvedených v častiach špecifických pre konkrétnu aplikáciu a podrobných vysvetlení uvedených v KROKOCH 1 – 4. Pozrite si prehľadovú tabuľku.

5.2 Prehľadová tabuľka

Kapacita aplikácie	Liekovky činidiel	Súprava hadičiek	Separačný program	Časť špecifická pre konkrétnu aplikáciu	Podrobné vysvetlenie častí opisujúcich KROKY 1 – 4			
					KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4
Anti-Biotin (REF 173-01) – obohacovanie								
celkový počet buniek ≤40×10^9	1× činidlo Anti-Biotin Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.3	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
Anti-Biotin (REF 173-01) – ochudobňovanie (aplikácia v normálnom rozsahu)								
celkový počet buniek ≤40×10^9	1× činidlo Anti-Biotin Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Anti-Biotin (REF 173-01) – ochudobňovanie (aplikácia vo veľkom rozsahu)								
celkový počet buniek >40– 80×10^9	2× činidlo Anti-Biotin Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.3	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CCS (REF 279-01) – obohacovanie								
Bunky vylučujúce IFN z celkového počtu 1×10^9 buniek	1 súprava (2 liekovky činidiel)	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.17	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – ochudobňovanie – časť 1 z 2								
5×10^9 CD19 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek (WBC)	1× činidlo CD19 Reagent a 1× CD1c (BDCA-1)-Biotin	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.12	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD1c (BDCA-1)-Biotin (REF 277-01) – obohacovanie – časť 2 z 2								
0,2×10^9 CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek (WBC)	1× činidlo Anti-Biotin Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.13	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD3 (REF 273-01) – ochudobňovanie (aplikácia v normálnom rozsahu)								
15×10^9 CD3 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD3 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Kapacita aplikácie	Liekovky činidiel	Súprava hadičiek	Separačný program	Časť špecifická pre konkrétnu aplikáciu	Podrobné vysvetlenie častí opisujúcich KROKY 1 – 4			
					KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4
CD3 (REF 273-01) – ochudobňovanie (aplikácia vo veľkom rozsahu)								
20×10^9 CD3 pozitívnych buniek z celkového počtu 80×10^9 buniek	2× činidlo CD3 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.5	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD3 (REF 273-01) – ochudobňovanie (aplikácia v normálnom rozsahu)								
15×10^9 CD3 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD3 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD3 (REF 273-01) – ochudobňovanie (aplikácia vo veľkom rozsahu)								
30×10^9 CD3 pozitívnych buniek z celkového počtu 80×10^9 buniek	2× činidlo CD3 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.5	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD4 (REF 276-01) – obohacovanie								
5×10^9 CD4 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD4 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.10	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD4 (REF 276-01) – ochudobňovanie								
12×10^9 CD4 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD4 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.10	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD8 (REF 275-01) – obohacovanie								
4×10^9 CD8 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD8 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.8	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD8 (REF 275-01) – ochudobňovanie								
4×10^9 CD8 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD8 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.8	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Kapacita aplikácie	Liekovky činidiel	Súprava hadičiek	Separačný program	Časť špecifická pre konkrétnu aplikáciu	Podrobné vysvetlenie častí opisujúcich KROKY 1 – 4			
					KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4
Kombinácia CD4/CD8 (REF 276-01/REF 275-01) – ochudobňovanie								
12×10^9 CD4 pozitívnych buniek a 4×10^9 CD8 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD4 Reagent a 1× činidlo CD8 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.11	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD14 (REF 272-01) – obohacovanie								
4×10^9 CD14 pozitívnych buniek z celkového počtu 20×10^9 buniek	1× činidlo CD14 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.2	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD19 (REF 179-01) – ochudobňovanie								
5×10^9 CD19 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD19 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.6	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
Kombinácia CD3/CD19 (REF 273-01/REF 179-01) – ochudobňovanie								
15×10^9 CD3 pozitívnych buniek a 5×10^9 CD19 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD3 Reagent a 1× činidlo CD19 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.7	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD25 (REF 274-01) – obohacovanie								
$0,6\times10^9$ CD25 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek (WBC)	1× činidlo CD25 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – obohacovanie								
$0,6\times10^9$ CD25 pozitívnych buniek s vysokouexpresiou z celkového počtu 40×10^9 buniek (WBC)	1× činidlo CD25 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.9	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
CD25 (REF 274-01) – ochudobňovanie (aplikácia v normálnom rozsahu)								
6×10^9 CD25 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek (WBC)	1× činidlo CD25 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4

Kapacita aplikácie	Liekovky činidiel	Súprava hadičiek	Separačný program	Časť špecifická pre konkrétnu aplikáciu	Podrobné vysvetlenie častí opisujúcich KROKY 1 – 4			
					KROK 1	KROK 2	KROK 3	KROK 4
CD25 (REF 274-01) – ochudobňovanie (aplikácia vo veľkom rozsahu)								
6 – 12×10^9 CD25 pozitívnych buniek z celkového počtu 80×10^9 buniek (WBC)	2× činidlo CD25 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	DEPLETION 2.1	6.9	7.1	7.2.5	7.3.1	7.4.4
CD34 (REF 171-01) – obohacovanie (aplikácia v normálnom rozsahu)								
0,6×10^9 CD34 pozitívnych buniek z celkového počtu 60×10^9 buniek	1× činidlo CD34 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	CD34 SELECTION 1	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1
CD34 (REF 171-01) – obohacovanie (aplikácia vo veľkom rozsahu)								
1,2×10^9 CD34 pozitívnych buniek z celkového počtu 120×10^9 buniek	2× činidlo CD34 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01)	CD34 SELECTION 2	6.1	7.1	7.2.2	7.3.1	7.4.1
CD45RA (REF 701-46) – ochudobňovanie								
20×10^9 CD45RA pozitívnych buniek z celkového počtu 50×10^9 buniek	1× činidlo CD45RA Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.16	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5
CD56 (REF 271-01) – obohacovanie								
5×10^9 CD56 pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD56 Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 1.1	6.4	7.1	7.2.3	7.3.1	7.4.2
CD304 (BDCA-4) (REF 278-01) – obohacovanie								
0,2×10^9 CD304 (BDCA-4) pozitívnych buniek z celkového počtu 40×10^9 buniek	1× činidlo CD304 (BDCA-4) Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01)	ENRICHMENT 3.2	6.14	7.1	7.2.4	7.3.1	7.4.3
TCRα/β-Biotin (REF 701-48/REF 173-01) – ochudobňovanie								
24×10^9 TCRα/β pozitívnych buniek z celkového počtu 60×10^9 buniek	1× TCRα/β-Biotin a 2× činidlo Anti-Biotin Reagent	1× súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01)	DEPLETION 3.1	6.15	7.1	7.2.6	7.3.3	7.4.5

Tabuľka 5.1: Prehľad dostupných aplikácií s príslušnými súpravami hadičiek a separačnými programami

6 Prehľad KROKOV 1 – 4 špecifický pre konkrétne aplikácie

6.1 Obohacovanie CD34 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD34 System vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD34 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set alebo súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie ľudských CD34 pozitívnych krvotvorných progenitórnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.1.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

- Aplikácia v normálnom rozsahu: do $0{,}6\times10^9$ CD34 pozitívnych buniek z celkového počtu do 60×10^9 buniek (WBC)
- Aplikácia vo veľkom rozsahu: viac ako $0{,}6\times10^9$ a do $1{,}2\times10^9$ CD34 pozitívnych buniek z celkového počtu do 120×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo	Separačný program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD34 Reagent	171-01	• 1 liekovka (normálny rozsah) • 2 liekovky (veľký rozsah)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek	CD34 SELECTION 1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek	CD34 SELECTION 2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3× 1 000 mL vaky[1]	–

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.1: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie CD34 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a dve súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  tri 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL transferový vak v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- vhodné injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

Ak je hmotnosť bunkového východiskového produktu väčšia ako 200 g, ale počet buniek je menší ako 120×10^9 celkových buniek a $1{,}2\times10^9$ CD34 pozitívnych buniek, odstreďte vzorku, aby sa objem zmenšil najviac na 200 g, a potom pokračujte nasledujúcimi krokmi.

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu ×2

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g) (aplikácia v normálnom rozsahu) alebo 190 g (±5 g) (aplikácia vo veľkom rozsahu)

1. Odstráňte supernatant a upravte vzorku pomocou nasledujúcej rovnice: hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť = hmotnosť zriedeného bunkového produktu – objem označovania
2. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD34 Reagent

1. Pridajte 1 alebo 2 liekovky činidla CliniMACS CD34 Reagent (pozrite si Tabuľka 6.1). Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ Odstránenie prebytočného činidla

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než tieto hodnoty, odporúča sa vykonať spolu tri premývacie kroky (namiesto len dvoch). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5 Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
6. Odstreďujte (200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
7. Odstráňte čo najviac supernatantu.
8. Bunkovú peletu resuspendujte.
9. Upravte objem nakladanej vzorky na 150 g (aplikácia v normálnom rozsahu) alebo 275 g (aplikácia vo veľkom rozsahu).

Poznámka: Po odstránení prebytočného činidla odoberte vzorku na prípadnú neskoršiu analýzu (voliteľné).

6.1.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument

▶ Voľba separačného programu CD34 SELECTION 1/2

(použitím 1 liekovky: CD34 SELECTION 1 alebo použitím 2 liekoviek: CD34 SELECTION 2)

Pozrite si časť 7.2.2 na strane 135.

6.1.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

- **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.1.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.1 na strane 191.

6.2 Obohacovanie CD14 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD14 vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD14 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie ľudských CD14 pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.2.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do 4×10^9 CD14 pozitívnych buniek z celkového počtu do 20×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógo-vé číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD14 Reagent	272-01	1 liekovka
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pozrite si Tabuľka 6.3 a Tabuľka 6.4. Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.2: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie CD14 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a jedna súprava na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL alebo jeden 600 mL transferový vak v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.4)
- **Ak je potrebná výmena vakov Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag:**
  dva 1 000 mL transferové vaky v kombinácii s dvomi prepojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector na pripojenie vakov k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.4)
- **Ak je na separáciu potrebný viac než jeden liter tlmivého roztoku:**
  jedna súprava na prenos plazmy na pripojenie vakov na tlmivý roztok (pozrite si Tabuľka 6.4)
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- vhodné injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G

Prehľad potrebných materiálov

Príprava buniek		
Celkový počet buniek (WBC)	20×10^9	20×10^9
Označené bunky	$\leq 2\times10^9$	$2 – 4\times10^9$
Počet liekoviek činidiel	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	1 000 mL
Súprava na prenos plazmy	1	1

Tabuľka 6.3: Materiál potrebný na prípravu CD14 pozitívnych buniek

Separácia		
Označené bunky	≤ 2×10^9	>2 – 4×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Súprava na prenos plazmy	–	1

Tabuľka 6.4: Materiál potrebný na obohacovanie CD14 pozitívnych buniek

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 600 g – hmotnosť bunkového východiskového produktu

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 50 g (±5 g)

1. Odstráňte supernatant a upravte vzorku pomocou nasledujúcej rovnice: hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť = hmotnosť zriedeného bunkového východiskového produktu – objem označovania
2. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD14 Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD14 Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 15 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g.

Poznámka: Po odstránení prebytočného činidla odoberte vzorku na prípadnú neskoršiu analýzu (voliteľné).

6.2.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu ENRICHMENT 1.1**

▶ **Zadanie parametrov vzorky**

Pozrite si časť 7.2.3 na strane 137.

6.2.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.2.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

▶ **Postup separácie**

▶ **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**

▶ **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**

▶ **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.2 na strane 195.

6.3 Obohacovanie/ochudobňovanie činidlom CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Systém CliniMACS Plus Anti-Biotin vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS Anti-Biotin Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set alebo súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie alebo ochudobňovanie ľudských buniek predtým označených biotinylovanými protilátkami.

6.3.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

- **Obohacovanie:** celkový počet buniek do 40×10^9 (WBC)
- **Ochudobňovanie:**
  Aplikácia v normálnom rozsahu: celkový počet buniek do 40×10^9 (WBC)
  Aplikácia vo veľkom rozsahu: celkový počet buniek viac ako 40×10^9 a do 80×10^9 (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo	Separačný program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	• 1 liekovka (normálny rozsah) • 2 liekovky (veľký rozsah)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	• 3 × 1 000 mL vaky[1] (normálny rozsah) • 4 × 1 000 mL vaky[1] (veľký rozsah)	–

1 Množstvo tlmivého roztoku sa líši v závislosti od zvoleného separačného programu a počtu označených buniek (pozrite si Tabuľka 6.6 až Tabuľka 6.9). Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.5: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie/ochudobňovanie činidlom CliniMACS Anti-Biotin Reagent

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a dve súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 600 mL alebo jeden 1 000 mL transferový vak v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.7 a Tabuľka 6.9)
- **Ak je potrebná výmena vakov Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a/alebo Priming Waste Bag:**
  dva až tri 1 000 mL transferové vaky v kombinácii s dvomi prepojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector na pripojenie vakov k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.7 a Tabuľka 6.9). Vymeňte vak Priming Waste Bag pomocou sterilného hadičkového konektora.
- **Ak je na separáciu potrebný viac než jeden liter tlmivého roztoku:**
  jedna až dve súpravy na prenos plazmy na pripojenie vakov na tlmivý roztok (pozrite si Tabuľka 6.7 a Tabuľka 6.9)
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- vhodné injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky
- individuálna biotinylovaná bunková špecifická protilátka alebo ligand

Prehľad materiálov

Príprava buniek (ENRICHMENT 1.1)	
Celkový počet buniek (WBC)	40×10^9
Počet liekoviek činidiel	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL
Súprava na prenos plazmy	2

Tabuľka 6.6: Materiály potrebné na prípravu buniek (ENRICHMENT 1.1)

Separácia (ENRICHMENT 1.1)		
Označené bunky	< 2×10^9	2 – 5×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Súprava na prenos plazmy	–	1

Tabuľka 6.7: Materiály potrebné na obohacovanie (ENRICHMENT 1.1)

Príprava buniek (DEPLETION 2.1)		
Celkový počet buniek (WBC)	≤40×10^9	>40 – 80×10^9
Počet liekoviek činidiel	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL	2 000 mL
Súprava na prenos plazmy	2	2

Tabuľka 6.8: Materiály potrebné na prípravu buniek (DEPLETION 2.1)

Separácia (DEPLETION 2.1)			
Označené bunky	< 5×10^9	5 – 13×10^9	>13 – 20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1 000 mL	1 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	4
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Súprava na prenos plazmy	–	1	2

Tabuľka 6.9: Materiály potrebné na ochudobňovanie (DEPLETION 2.1)

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu × 2

Odstreďovanie

1. Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).
2. Odstráňte supernatant a upravte objem na označenie primárnej protilátky podľa odporúčania výrobcu primárnej protilátky.
3. Bunkovú peletu resuspendujte.

Označenie buniek: inkubácia s primárnou protilátkou

Postupujte podľa návodu na použitie poskytnutého výrobcom primárnej protilátky.

Odstránenie prebytočného konjugátu (1. premytie)

1. Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 600 g – hmotnosť bunkového produktu
2. Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g) (aplikácia v normálnom rozsahu) alebo 190 g (±5 g) (aplikácia vo veľkom rozsahu)

1. Odstráňte supernatant a upravte vzorku pomocou nasledujúcej rovnice: hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť = hmotnosť zriedeného bunkového produktu – objem označovania

   Poznámka: Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
2. Bunkovú peletu resuspendujte.

Magnetické označovanie buniek: inkubácia s činidlom CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Pridajte 1 alebo 2 liekovky činidla CliniMACS Anti-Biotin Reagent (pozrite si Tabuľka 6.6 a Tabuľka 6.8). Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla (2. premytie)**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než hodnota uvedená vyššie, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g (aplikácia v normálnom rozsahu) alebo 200 g (aplikácia vo veľkom rozsahu).

Poznámka: Po odstránení prebytočného činidla odoberte vzorku na prípadnú neskoršiu analýzu (voliteľné).

6.3.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu ENRICHMENT 1.1 alebo DEPLETION 2.1**

▶ **Zadanie parametrov vzorky**

Pozrite si časť 7.2.3 na strane 137 alebo 7.2.5 na strane 144.

6.3.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.3.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

▶ **Postup separácie**

▶ **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**

▶ **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**

▶ **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.2 na strane 195 a 7.4.4 na strane 203.

6.4 Obohacovanie CD56 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD56 vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD56 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie ľudských CD56 pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.4.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do 5×10^9 CD56 pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD56 Reagent	271-01	1 liekovka
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pozrite si Tabuľka 6.11 a Tabuľka 6.12. Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.10: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie CD56 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a jedna súprava na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL alebo 600 mL transferový vak v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.12)

- **Ak je potrebná výmena vakov Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag:** dva 1000 mL transferové vaky v kombinácii s dvomi prepojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector na pripojenie vakov k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.12)
- **Ak je na separáciu potrebný viac než jeden liter tlmivého roztoku:** jedna súprava na prenos plazmy na pripojenie vakov na tlmivý roztok (pozrite si Tabuľka 6.12)
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

Prehľad potrebných materiálov

Príprava buniek	
Celkový počet buniek (WBC)	40×10^9
Počet liekoviek činidiel	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Súprava na prenos plazmy	1

Tabuľka 6.11: Materiály potrebné na prípravu CD56 pozitívnych buniek

Separácia		
Označené bunky	$< 2\times10^9$	$2 – 5\times10^9$
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Súprava na prenos plazmy	–	1

Tabuľka 6.12: Materiály potrebné na obohacovanie CD56 pozitívnych buniek

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 600 g – hmotnosť bunkového východiskového produktu

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g)

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice: cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = 95 g + hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Resuspendujte bunky.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD56 Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD56 Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 150 g.

Poznámka: Po odstránení prebytočného činidla odoberte vzorku na prípadnú neskoršiu analýzu (voliteľné).

6.4.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu ENRICHMENT 1.1**

▶ **Zadanie parametrov vzorky**

Pozrite si časť 7.2.3 na strane 137.

6.4.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.4.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

▶ **Postup separácie**

▶ **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**

▶ **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**

▶ **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.2 na strane 195.

6.5 Ochudobňovanie CD3 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD3 vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD3 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS alebo súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* ochudobňovanie ľudských CD3 pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.5.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

- Aplikácia v normálnom rozsahu: do 15×10^9 CD3 pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC) pri použití buď súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS, alebo súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set
- Aplikácia vo veľkom rozsahu: viac ako 15×10^9 a do 20×10^9 CD3 pozitívnych buniek z celkového počtu viac ako 40×10^9 a do 80×10^9 buniek (WBC) pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS, alebo viac ako 15×10^9 a do 30×10^9 CD3 pozitívnych buniek z celkového počtu viac ako 40×10^9 a do 80×10^9 buniek pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo	Separačný program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	• 1 liekovka (normálny rozsah) • 2 liekovky (veľký rozsah)	
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek	DEPLETION 2.1
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 súprava hadičiek	DEPLETION 3.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Max. 5 × 1 000 mL vaky[1]	

1 Pozrite si Tabuľka 6.14 až Tabuľka 6.16. Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

2 **Poznámka:** Pri vysokých počtoch označených buniek sa odporúča použiť súpravu hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set, aby sa ušetrila doba spracovania (napr. 20×10^9 označených buniek bude spracovaných do piatich hodín pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS oproti dvom hodinám pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set).

Tabuľka 6.13: Materiály CliniMACS potrebné na ochudobňovanie CD3 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a dve súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden až dva 600 mL transferové vaky v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek

  Ak sa na separáciu budú vyžadovať dva vaky Cell Collection Bag, na pripojenie oboch týchto vakov použite súpravu na prenos plazmy. Jeden 600 mL transferový vak je už pripojený k súprave hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (pozrite si Tabuľka 6.15 a Tabuľka 6.16).
- **Ak je potrebná výmena vakov Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a/alebo Priming Waste Bag:**
  dva až tri 1000 mL transferové vaky v kombinácii s dvomi prepojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector na pripojenie vakov k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.15 a Tabuľka 6.16)

  Vymeňte vak Priming Waste Bag pomocou sterilného hadičkového konektora.
- **Ak je na separáciu potrebný viac než jeden liter tlmivého roztoku:**
  jedna až dve súpravy na prenos plazmy na pripojenie vakov na tlmivý roztok (pozrite si Tabuľka 6.15 a Tabuľka 6.16)
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- imunoglobulín G na klinické použitie
- skúmavky na vzorky

DÔLEŽITÉ

Po zadaní parametrov vzorky (KROK 2) vypočíta softvér CliniMACS Plus objemy, ktoré sa budú zhromažďovať vo vakoch Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag a Buffer Waste Bag. Ak objem vypočítanej kvapaliny prekročí štandardný objem 500 mL, je potrebná výmena vakov.

Prehľad potrebných materiálov

Príprava buniek		
Celkový počet buniek (WBC)	≤40×10^9	>40 – 80×10^9
Označené bunky	≤15×10^9	>15 – 30×10^9
Počet liekoviek činidiel	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	2 000 mL	2 000 mL
Súprava na prenos plazmy	2	2
Objem nakladanej vzorky	150 mL	250 – 300 mL

Tabuľka 6.14: Materiály potrebné na prípravu CD3 pozitívnych buniek

Separácia (DEPLETION 2.1)			
Označené bunky	≤5×10^9	>5 – 13×10^9	>13 – 20×10^9
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	600 mL	1 – 2 × 600 mL	2 × 600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Súprava na prenos plazmy	–	1 – 2	3

Tabuľka 6.15: Materiály potrebné na ochudobňovanie CD3 pozitívnych buniek (DEPLETION 2.1)

Separácia (DEPLETION 3.1)		
Označené bunky	≤29×10^9	>29 – 30×10^9
Non-Target Cell Bag	Výmena vaku nie je potrebná	
Buffer Waste Bag		
Reapplication Bag		
Cell Collection Bag	–	1 × 600 mL (doplnkovo)
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	
Súprava na prenos plazmy	–	1

Tabuľka 6.16: Materiály potrebné na ochudobňovanie CD3 pozitívnych buniek (DEPLETION 3.1)

Poznámka: Materiály potrebné na separáciu sa dajú určiť aj zapnutím prístroja CliniMACS Plus Instrument, výberom separačného programu, ktorý sa má použiť (DEPLETION 2.1 pre súpravu hadičiek CliniMACS Tubing Set LS a DEPLETION 3.1 pre súpravu hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set), a zadaním parametrov vzorky. Softvér CliniMACS Plus vypočíta požadované veľkosti vakov, ktoré sa majú pripojiť k súprave hadičiek, a tiež požadovanú hmotnosť tlmivého roztoku.

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

Stanovte počet všetkých CD3 označených buniek (vrátane nešpecifickej CD3 väzby, nielen skutočných T buniek). Tento počet zohľadnite pri špecifikáciách aplikácie a zadávaní parametrov vzorky (pozrite si KROK 2).

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 600 g – hmotnosť bunkového východiskového produktu

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g) (aplikácia v normálnom rozsahu) alebo 190 g (±5 g) (aplikácia vo veľkom rozsahu)

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice (zohľadnite hmotnosť IgG): cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = objem označovania – hmotnosť IgG + hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s imunoglobulínom na klinické použitie

1. Pridajte IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 5 minút pri izbovej teplote.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD3 Reagent

1. Pridajte 1 alebo 2 liekovky činidla CliniMACS CD3 Reagent (pozrite si Tabuľka 6.14). Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 150 g (aplikácia v normálnom rozsahu) alebo 250 – 300 g (aplikácia vo veľkom rozsahu).

6.5.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu DEPLETION 2.1 alebo DEPLETION 3.1**
(pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS, resp. súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set)

▶ **Zadanie parametrov vzorky**
(podľa analýzy bunkového východiskového produktu (pozrite si KROK 1))

Pozrite si časť 7.2.5 na strane 144 alebo 7.2.6 na strane 149.

6.5.3 KROK 3: Inštalácia súpravy hadičiek CliniMACS

▶ **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**
alebo
▶ **Súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156 alebo 7.3.3 na strane 176.

6.5.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

▶ **Postup separácie**

▶ **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**

▶ **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**

▶ **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.4 na strane 203 a 7.4.5 na strane 207.

6.6 Ochudobňovanie CD19 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD19 vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD19 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* ochudobňovanie ľudských CD19 pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.6.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do 5×10^9 CD19 pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 liekovka
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2×1000 mL vaky[1]

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.17: Materiály CliniMACS potrebné na ochudobňovanie CD19 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a jedna súprava na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 600 g – hmotnosť bunkového východiskového produktu

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g)

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice: cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = 95 g + hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD19 Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD19 Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ Odstránenie prebytočného činidla

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g.

6.6.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument

▶ Výber separačného programu DEPLETION 2.1

▶ Zadanie parametrov vzorky

Pozrite si časť 7.2.5 na strane 144.

6.6.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.6.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.4 na strane 203.

6.7 Ochudobňovanie CD3 pozitívnych buniek a CD19 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD3/CD19 vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD3 Reagent, činidla CliniMACS CD19 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na súbežné *in vitro* ochudobňovanie ľudských CD3 pozitívnych buniek a ľudských CD19 pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.7.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do 15×10^9 CD3 pozitívnych buniek a do 5×10^9 CD19 pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógo-vé číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD3 Reagent	273-01	1 liekovka
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 liekovka
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.18: Materiály CliniMACS potrebné na ochudobňovanie CD3 pozitívnych buniek a CD19 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a dve súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden až dva 600 mL transferové vaky v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- imunoglobulín G na klinické použitie
- skúmavky na vzorky

DÔLEŽITÉ

Po zadaní parametrov vzorky (KROK 2) vypočíta softvér CliniMACS Plus objemy, ktoré sa budú zhromažďovať vo vakoch Reapplication Bag, Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag a Buffer Waste Bag. Ak objem vypočítanej kvapaliny prekročí štandardný objem 500 mL, je potrebná výmena požadovaných vakov.

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

Stanovte počet všetkých CD3 a CD19 označených buniek (vrátane nešpecifickej CD3 a CD19 väzby, nielen skutočných T a B buniek). Tento počet zohľadnite pri špecifikáciách aplikácie a zadávaní parametrov vzorky (pozrite si KROK 2).

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 600 g – hmotnosť bunkového východiskového produktu

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 87,5 g (±5 g)

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice (zohľadnite hmotnosť IgG): cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = 87,5 g – hmotnosť IgG + hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s imunoglobulínom na klinické použitie

1. Pridajte IgG (1,5 mg/mL).
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 5 minút pri izbovej teplote.

▶ Inkubácia s činidlami CliniMACS CD3 Reagent a CliniMACS CD19 Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD3 Reagent a 1 liekovku činidla CliniMACS CD19 Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 150 g.

6.7.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu DEPLETION 3.1**

▶ **Zadanie parametrov vzorky**
(podľa analýzy bunkového východiskového produktu (pozrite si KROK 1))

Pozrite si časť 7.2.6 na strane 149.

6.7.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ **Súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set**

Pozrite si časť 7.3.3 na strane 176.

6.7.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

▶ **Postup separácie**

▶ **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**

▶ **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**

▶ **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.5 na strane 207.

6.8 Obohacovanie/ ochudobňovanie CD8 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD8 vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD8 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set alebo súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie alebo ochudobňovanie ľudských CD8 pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.8.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

- **Obohacovanie:** do 4×10^9 označených pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC) pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set
- **Ochudobňovanie:** do 4×10^9 označených buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC) pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo	Separačný program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 liekovka	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Do 3 × 1 000 mL vaky[1]	–

1 Pozrite si Tabuľka 6.20 až Tabuľka 6.22. Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.19: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie/ochudobňovanie CD8 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a jedna súprava na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.21 a Tabuľka 6.22)
- **Ak je potrebná výmena vakov Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag:**
  dva 1000 mL transferové vaky v kombinácii s dvomi prepojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector na pripojenie vakov k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.21 a Tabuľka 6.22).
- **Ak je na separáciu potrebný viac než jeden liter tlmivého roztoku:**
  jedna súprava na prenos plazmy na pripojenie vakov na tlmivý roztok (pozrite si Tabuľka 6.21 a Tabuľka 6.22)
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

DÔLEŽITÉ

Po zadaní parametrov vzorky (KROK 2) vypočíta softvér CliniMACS Plus objemy, ktoré sa budú zhromažďovať vo vakoch Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Ak objem vypočítanej kvapaliny prekročí štandardný objem 500 mL, je potrebná výmena vakov podľa nasledujúceho prehľadu potrebných materiálov.

Prehľad potrebných materiálov

Príprava buniek	
Celkový počet buniek	≤ 40×10^9
Označené bunky	< 4×10^9
Počet liekoviek činidiel	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Súprava na prenos plazmy	1
Objem nakladanej vzorky	100 mL

Tabuľka 6.20: Materiály potrebné na prípravu CD8 pozitívnych buniek

Separácia (ENRICHMENT 1.1)		
Označené bunky	≤ 2×10^9	$2 – 4\times10^9$
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Súprava na prenos plazmy	–	1

Tabuľka 6.21: Materiály potrebné na obohacovanie CD8 pozitívnych buniek

Separácia (DEPLETION 2.1)	
Označené bunky	≤ 4×10^9
Negative Fraction Bag	Výmena vaku nie je potrebná
Buffer Waste Bag	
Priming Waste Bag	
Cell Collection Bag	600 mL
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Luer/Spike Interconnector	1

Tabuľka 6.22: Materiály potrebné na ochudobňovanie CD8 pozitívnych buniek

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu × 2

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g)

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku. Vypočítajte cieľovú hmotnosť vaku CPB naplneného zriedeným bunkovým produktom pomocou nasledujúcej rovnice: cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = 95 g – hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD8 Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD8 Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ Odstránenie prebytočného činidla

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g.

6.8.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument

▶ Výber separačného programu ENRICHMENT 1.1 alebo DEPLETION 2.1

▶ Zadanie parametrov vzorky

Pozrite si časť 7.2.3 na strane 137 alebo 7.2.5 na strane 144.

6.8.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.8.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.2 na strane 195 alebo 7.4.4 na strane 203.

6.9 Obohacovanie/ochudobňovanie CD25 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD25 System vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD25 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set alebo súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie alebo ochudobňovanie ľudských CD25 pozitívnych buniek – pokiaľ možno CD25 buniek s vysokou expresiou – z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.9.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

- **Obohacovanie:** CD25 pozitívne bunky alebo CD25 bunky s vysokou expresiou: do $0{,}6\times10^9$ označených pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC) pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set
- **Ochudobňovanie:**
  Aplikácia v normálnom rozsahu: do 6×10^9 CD25 pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC) pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS
  Aplikácia vo veľkom rozsahu: viac ako 6×10^9 a do 12×10^9 CD25 pozitívnych buniek z celkového počtu viac ako 40×10^9 a do 80×10^9 buniek (WBC) pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo	Separačný program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD25 Reagent	274-01	• 1 liekovka (normálny rozsah) • 2 liekovky (veľký rozsah)	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek	ENRICHMENT 3.2
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	Max. 4 × 1 000 mL vaky[1]	–

1 Pozrite si Tabuľka 6.24 až Tabuľka 6.27. Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.23: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie/ochudobňovanie CD25 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a jedna až dve súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL (alebo dva 1 000 mL) transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL alebo jeden až dva 600 mL transferové vaky v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek

  Ak sa na separáciu budú vyžadovať dva vaky Cell Collection Bag, na pripojenie oboch týchto vakov použite súpravu na prenos plazmy (pozrite si Tabuľka 6.25 a Tabuľka 6.27).
- **Ak je potrebná výmena vakov Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag:**
  dva 1000 mL transferové vaky v kombinácii s dvomi prepojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector na pripojenie vakov k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.25 a Tabuľka 6.27).
- **Ak je na separáciu potrebný viac než jeden liter tlmivého roztoku:**
  jedna súprava na prenos plazmy na pripojenie vakov na tlmivý roztok (pozrite si Tabuľka 6.25 a Tabuľka 6.27)
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

DÔLEŽITÉ

Po zadaní parametrov vzorky (KROK 2) vypočíta softvér CliniMACS Plus objemy, ktoré sa budú zhromažďovať vo vakoch Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Ak objem vypočítanej kvapaliny prekročí štandardný objem 500 mL, je potrebná výmena vakov podľa nasledujúceho prehľadu potrebných materiálov.

Prehľad potrebných materiálov

Príprava buniek (ENRICHMENT 3.2)		
Aplikácia	**Obohacovanie CD25 pozitívnych buniek**	**Obohacovanie CD25 buniek s vysokou expresiou**
Celkový počet buniek (WBC)	≤ 40×10^9	≤ 40×10^9
Označené bunky	≤ $0{,}6\times10^9$	≤ $0{,}6\times10^9$
Počet liekoviek činidiel	1	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 – 2 000 mL	2 000 mL
Súprava na prenos plazmy	1 – 2	2
Objem označovania	190 mL	380 mL
Teplota označovania	izbová teplota	+4 až +8 °C (+39 až +46 °F)

Tabuľka 6.24: Materiály potrebné na prípravu CD25 pozitívnych buniek/buniek s vysokou expresiou (ENRICHMENT 3.2)

Separácia (ENRICHMENT 3.2)		
Aplikácia	**Obohacovanie CD25 pozitívnych buniek**	**Obohacovanie CD25 buniek s vysokou expresiou**
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	1 000 mL
Negative Fraction Bag	Výmena vaku nie je potrebná	
Buffer Waste Bag		
Priming Waste Bag		
Cell Collection Bag	150 mL	150 mL
Luer/Spike Interconnector	1	1

Tabuľka 6.25: Materiály potrebné na obohacovanie CD25 pozitívnych buniek/buniek s vysokou expresiou (ENRICHMENT 3.2)

Príprava buniek (DEPLETION 2.1)		
Celkový počet buniek (WBC)	≤ 40×10^9	> 40 – 80×10^9
Označené bunky	≤ 6×10^9	> 6 – 12×10^9
Počet liekoviek činidiel	1	2
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 – 2 000 mL	1 000 – 2 000 mL
Súprava na prenos plazmy	1 – 2	1 – 2
Objem označovania	95 mL	190 mL
Teplota označovania	izbová teplota	izbová teplota

Tabuľka 6.26: Materiály potrebné na prípravu CD25 pozitívnych buniek (DEPLETION 2.1)

Separácia (DEPLETION 2.1)		
Celkový počet buniek (WBC)	≤ 40×10^9	> 40 – 80×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL pre < 5×10^9 označených buniek	2 000 mL pre 5 – 12×10^9 označených buniek
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	600 mL	2 × 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Súprava na prenos plazmy	–	2

Tabuľka 6.27: Materiály potrebné na ochudobňovanie CD25 pozitívnych buniek (DEPLETION 2.1)

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

DÔLEŽITÉ

- Tlmivý roztok na prípravu buniek na obohacovanie alebo ochudobňovanie CD25 pozitívnych buniek skladujte pri teplote +19 až +25 °C (+66 až +77 °F).
- Magnetické označovanie počas prípravy buniek na obohacovanie CD25 buniek s vysokou expresiou sa musí vykonávať pomocou studeného tlmivého roztoku (+4 až +8 °C [+39 až +46 °F]). Nižšia alebo vyššia teplota môže mať za následok nižšiu čistotu a výťažnosť cieľových buniek.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu × 2

Odstreďovanie

Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

Úprava objemu: objem označovania na

obohacovanie CD25 pozitívnych buniek: 190 g (±5 g)
obohacovanie CD25 buniek s vysokou expresiou: 380 g (±5 g)[1]
ochudobňovanie CD25 pozitívnych buniek (aplikácia v normálnom rozsahu): 95 g
ochudobňovanie CD25 pozitívnych buniek (aplikácia vo veľkom rozsahu): 190 g

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice: cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = objem označovania + hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

Inkubácia s činidlom CliniMACS CD25 Reagent

1. Pridajte 1 alebo 2 liekovky činidla CliniMACS CD25 Reagent (pozrite si Tabuľka 6.24 a Tabuľka 6.26). Obsah jemne premiešajte
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min):
   a) obohacovanie alebo ochudobňovanie CD25 pozitívnych buniek: po dobu 30 minút pri izbovej teplote
   b) obohacovanie CD25 buniek s vysokou expresiou: po dobu 15 minút pri teplote +4 až +8 °C (+39 až +46 °F)

Odstránenie prebytočného činidla

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

1 Magnetické označovanie na účely obohacovania CD25 buniek s vysokou expresiou sa musí vykonávať pomocou studeného tlmivého roztoku (+4 až +8°C [+39 až +46 °F]).

5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g (aplikácia v normálnom rozsahu) alebo 200 g (aplikácia vo veľkom rozsahu).

6.9.2 KROK 2: Výber separačného programu

- **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**
- **Výber separačného programu ENRICHMENT 3.2 alebo DEPLETION 2.1**
- **Zadanie parametrov vzorky**
  (nie pre ENRICHMENT 3.2)

Pozrite si časť 7.2.4 na strane 142 alebo 7.2.5 na strane 144.

6.9.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

- **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.9.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.3 na strane 199 alebo 7.4.4 na strane 203.

6.10 Obohacovanie/ ochudobňovanie CD4 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD4 vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD4 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set alebo súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie alebo ochudobňovanie ľudských CD4 pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.10.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

- **Obohacovanie:** do 5×10^9 označených pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC) pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set
- **Ochudobňovanie:** do 12×10^9 označených buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC) pri použití súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS

Poznámka: Ak počet vypočítaných buniek prekročí kapacitu aplikácie, vzorku rozdeľte a pokračujte s každou vzorkou samostatne, pričom pri každej analýze pomocou prístroja CliniMACS Plus Instrument použite novú súpravu hadičiek.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo	Separačný program
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1	–
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 liekovka	–
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek	ENRICHMENT 1.1
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek	DEPLETION 2.1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	max. 4 × 1 000 mL vaky[1]	–

1 Pozrite si Tabuľka 6.29 až Tabuľka 6.32. Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.28: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie/ochudobňovanie CD4 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a jedna súprava na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL (alebo dva 1 000 mL) transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL alebo jeden až dva 600 mL transferové vaky v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek

  Ak sa na separáciu budú vyžadovať dva vaky Cell Collection Bag, na pripojenie oboch týchto vakov použite súpravu na prenos plazmy (pozrite si Tabuľka 6.30 a Tabuľka 6.32).
- **Ak je potrebná výmena vakov Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a/alebo Priming Waste Bag:**
  max. tri 1 000 mL transferové vaky v kombinácii s dvomi prepojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector na pripojenie vakov k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.30 a Tabuľka 6.32)

  Vymeňte vak Priming Waste Bag pomocou sterilného hadičkového konektora.
- **Ak je na separáciu potrebný viac než jeden liter tlmivého roztoku:**
  jedna až dve súpravy na prenos plazmy na pripojenie vakov na tlmivý roztok (pozrite si Tabuľka 6.30 a Tabuľka 6.32)
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

DÔLEŽITÉ

Po zadaní parametrov vzorky (KROK 2) vypočíta softvér CliniMACS Plus objemy, ktoré sa budú zhromažďovať vo vakoch Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Ak objem vypočítanej kvapaliny prekročí štandardný objem 500 mL, je potrebná výmena vakov podľa nasledujúceho prehľadu potrebných materiálov.

Prehľad potrebných materiálov

Príprava buniek (ENRICHMENT 1.1)	
Celkový počet buniek (WBC)	≤40×10^9
Označené bunky	≤5×10^9
Počet liekoviek činidiel	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Súprava na prenos plazmy	1

Tabuľka 6.29: Materiály potrebné na prípravu CD4 pozitívnych buniek (ENRICHMENT 1.1)

Separácia (ENRICHMENT 1.1)		
Označené bunky	≤2×10^9	>2 – 5×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	150 mL	600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Súprava na prenos plazmy	–	1

Tabuľka 6.30: Materiály potrebné na obohacovanie CD4 pozitívnych buniek (ENRICHMENT 1.1)

Príprava buniek (DEPLETION 2.1)	
Celkový počet buniek (WBC)	≤40×10^9
Označené bunky	≤12 × 10^9
Počet liekoviek činidiel	1
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Súprava na prenos plazmy	1

Tabuľka 6.31: Materiály potrebné na prípravu CD4 pozitívnych buniek (DEPLETION 2.1)

Separácia (DEPLETION 2.1)		
Označené bunky	< 5×10^9	5 – 12×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–	
Priming Waste Bag	–	–
Cell Collection Bag	1 × 600 mL	1 – 2 × 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3
Súprava na prenos plazmy	–	1 – 2

Tabuľka 6.32: Materiály potrebné na ochudobňovanie CD4 pozitívnych buniek (DEPLETION 2.1)

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu × 2

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g)

1. Odstráňte supernatant a upravte vzorku pomocou nasledujúcej rovnice: hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť = hmotnosť zriedeného bunkového produktu – 95 g
2. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD4 Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD4 Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ Odstránenie prebytočného činidla

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g.

6.10.2 KROK 2: Výber separačného programu

- **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**
- **Výber separačného programu ENRICHMENT 1.1 alebo DEPLETION 2.1**
- **Zadanie parametrov vzorky**

Pozrite si časť 7.2.3 na strane 137 a 7.2.5 na strane 144.

6.10.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

- **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.10.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.2 na strane 195 alebo 7.4.4 na strane 203.

6.11 Ochudobňovanie CD4 pozitívnych buniek a CD8 pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD4/CD8 System vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD4 Reagent, činidla CliniMACS CD8 Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na súbežné *in vitro* ochudobňovanie ľudských CD4 pozitívnych buniek a CD8 pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.11.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do 12×10^9 CD4 pozitívnych buniek a max. 4×10^9 CD8 pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC)

Poznámka: Ak počet vypočítaných buniek prekročí kapacitu aplikácie, vzorku rozdeľte a pokračujte s každou vzorkou samostatne, pričom pri každej analýze pomocou prístroja CliniMACS Plus Instrument použite novú súpravu hadičiek.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD4 Reagent	276-01	1 liekovka
CliniMACS CD8 Reagent	275-01	1 liekovka
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	max. 4 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pozrite si Tabuľka 6.34 a Tabuľka 6.35. Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.33: Materiály CliniMACS potrebné na ochudobňovanie CD4 pozitívnych buniek a CD8 pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a jedna súprava na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL (alebo dva 1 000 mL) transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden až dva 600 mL transferové vaky v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek

  Ak sa na separáciu budú vyžadovať dva vaky Cell Collection Bag, na pripojenie týchto vakov použite súpravu na prenos plazmy (pozrite si Tabuľka 6.35).

- **Ak je potrebná výmena vakov Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a/alebo Priming Waste Bag:**
  max. tri 1 000 mL transferové vaky v kombinácii s dvomi prepojovacími spojkami Luer/Spike Interconnector na pripojenie vakov k súprave hadičiek (pozrite si Tabuľka 6.35)

  Vymeňte vak Priming Waste Bag pomocou sterilného hadičkového konektora.
- **Ak je na separáciu potrebný viac než jeden liter tlmivého roztoku:**
  jedna až dve súpravy na prenos plazmy na pripojenie vakov na tlmivý roztok (pozrite si Tabuľka 6.35)
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

DÔLEŽITÉ

Po zadaní parametrov vzorky (KROK 2) vypočíta softvér CliniMACS Plus objemy, ktoré sa budú zhromažďovať vo vakoch Priming Waste Bag, Cell Collection Bag, Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Ak objem vypočítanej kvapaliny prekročí štandardný objem 500 mL, je potrebná výmena vakov podľa nasledujúceho prehľadu potrebných materiálov.

Prehľad potrebných materiálov

Príprava buniek	
Celkový počet buniek (WBC)	$\leq 40\times10^9$
Označené bunky	$\leq 12\times10^9$ CD4 pozitívnych buniek a $\leq 4\times10^9$ CD8 pozitívnych buniek
Počet liekoviek činidiel	1 liekovka činidla CliniMACS CD4 Reagent a 1 liekovka činidla CliniMACS CD8 Reagent
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL
Súprava na prenos plazmy	1

Tabuľka 6.34: Materiály potrebné na prípravu CD4 pozitívnych a CD8 pozitívnych buniek

Separácia			
Označené bunky	< 5×10^9	5 – 13×10^9	>13 – 16×10^9
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	1 000 mL	2 000 mL	3 000 mL
Negative Fraction Bag	–	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi	Originálne vaky zo súpravy hadičiek nahraďte 1 000 mL transferovými vakmi
Buffer Waste Bag	–		
Priming Waste Bag	–	–	
Cell Collection Bag	1 × 600 mL	1 – 2 × 600 mL	2 × 600 mL
Luer/Spike Interconnector	1	3	3
Súprava na prenos plazmy	–	1 – 2	3

Tabuľka 6.35: Materiály potrebné na ochudobňovanie CD4 pozitívnych a CD8 pozitívnych buniek

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu × 2

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F])

▶ Úprava objemu: objem označovania 88 g (±5 g)

1. Odstráňte supernatant a upravte vzorku pomocou nasledujúcej rovnice: hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť = hmotnosť zriedeného bunkového produktu – objem označovania
2. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ **Inkubácia s činidlami CliniMACS CD4 Reagent a CliniMACS CD8 Reagent**

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD4 Reagent a 1 liekovku činidla CliniMACS CD8 Reagent. Obsah jemne premiešajte
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g.

6.11.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu DEPLETION 2.1**

▶ **Zadanie parametrov vzorky**

Pozrite si časť 7.2.5 na strane 144.

6.11.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.11.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.4 na strane 203.

6.12 Obohacovanie CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek – časť 1: Ochudobňovanie CD19 pozitívnych buniek a označovanie CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidiel CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie ľudských CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií po ochudobnení CD19 pozitívnych buniek.

6.12.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Ochudobňovanie do 5×10^9 CD19 pozitívnych buniek a označovanie do $0{,}2\times10^9$ CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógo-vé číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin	277-01	1 liekovka
CliniMACS CD19 Reagent	179-01	1 liekovka
CliniMACS Tubing Set LS	162-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	2 × 1000 mL vaky[1]

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.36: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek (časť 1)

Ďalšie potrebné materiály (pre časť 1 a časť 2)

- **Cell Preparation Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie, ako aj dve spojky miesta odberu vzoriek a tri súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupov prípravy buniek
- **Vaky Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  päť 600 mL transferových vakov vhodných na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag (Part 1):**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek
- **Cell Collection Bag (Part 2):**
  jeden 150 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie transferového vaku k súprave hadičiek
- dva filtre Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

Magnetické označovanie buniek (časť 1)

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu × 2

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 90 g (±5 g)

1. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
2. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag Part 1 (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice: cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB Part 1 = 90 g + hmotnosť prázdneho vaku CPB
3. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlami CliniMACS CD19 Reagent a CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD19 Reagent a 1 liekovku činidla CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ Odstránenie prebytočného činidla

1. Vak Cell Preparation Bag Part 1 naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g.

6.12.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument

▶ Výber separačného programu DEPLETION 2.1

▶ Zadanie parametrov vzorky

Pozrite si časť 7.2.5 na strane 144.

6.12.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

- **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.12.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.4 na strane 203.

6.13 Obohacovanie CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek – časť 2: Flexible Labeling System

Systém CliniMACS Plus CD1c (BDCA-1)-Biotin vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidiel CliniMACS CD1c (BDCA-1)-Biotin, CliniMACS CD19 Reagent, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie ľudských CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií po ochudobnení CD19 pozitívnych buniek.

6.13.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do $0{,}2\times10^9$ CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	1 liekovka
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.37: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie CD1c (BDCA-1) pozitívnych buniek (časť 2)

Ďalšie potrebné materiály

Ďalšie potrebné materiály uvádza časť 1.

▶ **Príprava vakov**

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek (produkt ochudobnený o CD19 bunky (časť 2))

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Prenos bunkového východiskového produktu ochudobneného o CD19 bunky do vaku Cell Preparation Bag Part 2

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu ochudobneného o CD19 bunky

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 600 g – hmotnosť bunkového východiskového produktu ochudobneného o CD19 bunky

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g)

1. Odstráňte supernatant a upravte vzorku pomocou nasledujúcej rovnice: hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť = hmotnosť zriedeného bunkového produktu – objem označovania
2. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS Anti-Biotin Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ Odstránenie prebytočného činidla

1. Vak Cell Preparation Bag Part 2 naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Vak Cell Preparation Bag Part 2 naplňte tlmivým roztokom.
6. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
7. Odstráňte čo najviac supernatantu.
8. Bunkovú peletu resuspendujte.
9. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g.

6.13.2 KROK 2: Výber separačného programu

- **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**
- **Výber separačného programu ENRICHMENT 3.2**

Pozrite si časť 7.2.4 na strane 142.

6.13.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

- **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.13.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.3 na strane 199.

6.14 Obohacovanie CD304 (BDCA-4) pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD304 (BDCA-4) vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie ľudských CD304 (BDCA-4) pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.14.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do $0{,}2\times10^9$ CD304 (BDCA-4) pozitívnych buniek z celkového počtu do 40×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent	278-01	1 liekovka
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	4 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.38: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie CD304 (BDCA-4) pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a tri súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupov prípravy buniek
- **Vaky Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  päť 600 mL transferových vakov vhodných na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  jeden 150 mL transferový vak v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie vaku Cell Collection Bag k súprave hadičiek
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie ochudobneného bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 600 g – hmotnosť bunkového východiskového produktu

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

▶ Dvakrát zopakujte kroky „Riedenie bunkového východiskového produktu“ a „Odstreďovanie“

1. Naplňte jeden transferový vak na 600 g.
2. Odstreďujte pri 300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).
3. Odstráňte supernatant.

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g)

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice: cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = 95 g + hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD304 (BDCA-4) Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 100 g.

6.14.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu ENRICHMENT 3.2**

Pozrite si časť 7.2.4 na strane 142.

6.14.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.14.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

▶ **Postup separácie**

▶ **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**

▶ **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**

▶ **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.3 na strane 199.

6.15 Ochudobňovanie TCRα/β pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidiel CliniMACS TCRα/β-Biotin, CliniMACS Anti-Biotin Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* ochudobňovanie ľudských TCRα/β pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.15.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do 24×10^9 TCRα/β pozitívnych buniek z celkového počtu do 60×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógo-vé číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS TCRα/β-Biotin	701-48	1 liekovka
CliniMACS Anti-Biotin Reagent	173-01	2 liekovky
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	max. 4 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.39: Materiály CliniMACS potrebné na ochudobňovanie TCRα/β pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a dve súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Vaky Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  štyri 600 mL (alebo 1 000 mL) transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  Jeden 600 mL vak Cell Collection Bag je už primontovaný k súprave hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set.
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

Stanovte percento/celkový počet všetkých TCRα/β označených buniek (vrátane nešpecifickej väzby TCRα/β, nie iba skutočných TCRα/β pozitívnych buniek). Tento počet zohľadnite pri špecifikáciách aplikácie a zadávaní parametrov vzorky (pozrite si KROK 2).

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu × 2

▶ Odstreďovanie

1. Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).
2. Odstráňte supernatant.

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g)

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice: cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = 95 g + hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Označenie buniek: inkubácia s činidlom CliniMACS TCRα/β-Biotin

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS TCRα/β-Biotin. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného konjugátu: zopakujte tento krok**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu.
4. Bunkovú peletu resuspendujte a upravte hmotnosť na 190 g po druhom premytí.

▶ **Magnetické označovanie buniek: inkubácia s činidlom CliniMACS Anti-Biotin Reagent**

1. Pridajte 2 liekovky činidla CliniMACS Anti-Biotin Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky na 150 g. Odporúča sa maximálna koncentrácia WBC 0,4×10^9 WBC/mL.

6.15.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu DEPLETION 3.1**

▶ **Zadanie parametrov vzorky**

Pozrite si časť 7.2.6 na strane 149.

6.15.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ **Súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set**

Pozrite si časť 7.3.3 na strane 176.

6.15.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.5 na strane 207.

6.16 Ochudobňovanie CD45RA pozitívnych buniek

Systém CliniMACS Plus CD45RA vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, činidla CliniMACS CD45RA Reagent, súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie ľudských CD45RA pozitívnych buniek z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.16.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Do 20×10^9 CD45RA pozitívnych buniek z celkového počtu do 50×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógo-vé číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS CD45RA Reagent	701-46	1 liekovka
CliniMACS Depletion Tubing Set	261-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.40: Materiály CliniMACS potrebné na ochudobňovanie CD45RA pozitívnych buniek

Ďalšie potrebné materiály

- **Vaky Cell Preparation Bag:**
  jeden 600 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie, ako aj jedna spojka miesta odberu vzoriek a dve súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupu prípravy buniek
- **Vaky Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag:**
  Jeden 600 mL vak Cell Collection Bag je už primontovaný k súprave hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set.
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky

DÔLEŽITÉ

Alternatívnym zdrojom východiskových buniek môže byť frakcia necieľových buniek zo separácie CD34 buniek pomocou systému CliniMACS Plus. Použitie činidla CliniMACS CD45RA Reagent sa odporúča len u bunkových východiskových produktov obsahujúcich CD45RA pozitívne bunky v normálnom frekvenčnom rozsahu (do 80 %). Vyššie frekvencie boli zaznamenané u niekoľkých darcov, kde je CD45RA exprimovaný takmer všetkými PBMC v dôsledku zriedkavej mutácie v géne CD45. V týchto prípadoch môže byť účinnosť ochudobňovania a/alebo výťažnosť nedostatočná.

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Magnetické označovanie buniek

Podrobný opis nasledujúcich krokov uvádza časť 7.1 „KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie“ na strane 121.

▶ Analýza bunkového východiskového produktu

Stanovte percentuálny/celkový počet všetkých CD45RA označených buniek (vrátane nešpecifickej väzby CD45RA, nielen skutočných CD45RA pozitívnych buniek). Tento počet zohľadnite pri špecifikáciách aplikácie a zadávaní parametrov vzorky (pozrite si KROK 2).

▶ Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

▶ Riedenie ochudobneného bunkového východiskového produktu

Pridajte tlmivý roztok: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = hmotnosť bunkového východiskového produktu × 2

▶ Odstreďovanie

Odstreďujte pri 200 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote (IT: +19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).

Ak sa ako alternatívny zdroj východiskových buniek použije frakcia necieľových buniek zo separácie CD34 buniek pomocou systému CliniMACS Plus, krok riedenia je možné vynechať. Pokračujte krokom odstreďovania a odstreďujte bunky pri 300 × g (bez brzdy) po dobu 15 minút pri izbovej teplote.

▶ Úprava objemu: objem označovania 95 g (±5 g)

1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu.
2. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu opatrne resuspendujte.
3. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) pridaním tlmivého roztoku pomocou nasledujúcej rovnice: cieľová hmotnosť naplneného vaku CPB = 95 g + hmotnosť prázdneho vaku CPB
4. Bunkovú peletu resuspendujte.

▶ Inkubácia s činidlom CliniMACS CD45RA Reagent

1. Pridajte 1 liekovku činidla CliniMACS CD45RA Reagent. Obsah jemne premiešajte.
2. Inkubujte na orbitálnom rotátore (25 ot./min) po dobu 30 minút pri izbovej teplote.

▶ **Odstránenie prebytočného činidla**

1. Vak Cell Preparation Bag naplňte tlmivým roztokom.
2. Odstreďujte (300 × g bez brzdy po dobu 15 minút pri izbovej teplote).
3. Odstráňte čo najviac supernatantu. **Poznámka:** Odstráňte aspoň 500 g supernatantu. Ak je množstvo odstráneného supernatantu menšie než 500 g, odporúča sa vykonať celkovo dva premývacie kroky (namiesto len jedného). V opačnom prípade môže byť odstránenie nenaviazaného činidla nedostatočné.
4. Bunkovú peletu resuspendujte.
5. Upravte objem nakladanej vzorky. Vypočítajte hmotnosť tlmivého roztoku potrebnú na úpravu hmotnosti bunkovej suspenzie na približne 125 g. Koncentrácia buniek by nemala prekročiť $0{,}4\times10^9$ WBC/mL: hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať = 125 g – hmotnosť bunkového produktu po premytí (g)

6.16.2 KROK 2: Výber separačného programu

▶ **Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument**

▶ **Výber separačného programu DEPLETION 3.1**

▶ **Zadanie parametrov vzorky**

Pozrite si časť 7.2.6 na strane 149.

6.16.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

▶ **Súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set**

Pozrite si časť 7.3.3 na strane 176.

6.16.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

▶ **Postup separácie**

▶ **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**

▶ **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**

▶ **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.5 na strane 207.

6.17 Obohacovanie ľudských buniek vylučujúcich IFN-gamma pomocou systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)

Systém CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) vrátane prístroja CliniMACS Plus Instrument, systému CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma), súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer je určený na *in vitro* obohacovanie ľudských buniek vylučujúcich IFN-gamma z heterogénnych hematologických bunkových populácií.

6.17.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

Prvé vyžadované činnosti

Kapacita aplikácie

Bunky vylučujúce IFN-gamma z celkového počtu do 1×10^9 buniek (WBC)

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nedostatočnej účinnosti separácie označených buniek. Pri prekročení špecifikácií aplikácie hrozí riziko nedostatočného špecifického označenia. Použite vyžadované množstvo buniek a činidlo podľa opisu pre príslušnú aplikáciu.

Potrebné materiály CliniMACS

Materiál	Katalógové číslo	Množstvo
CliniMACS Plus Instrument	151-01	1
CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma)	279-01	1 súprava
CliniMACS Tubing Set	161-01	1 súprava hadičiek
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	700-25	3 × 1 000 mL vaky[1]

1 Pred použitím doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Tabuľka 6.41: Materiály CliniMACS potrebné na obohacovanie ľudských buniek vyučujúcich IFN-gamma

DÔLEŽITÉ

Tlmivý roztok na prípravu buniek skladujte v chlade pri teplote +2 až +8 °C (+36 až +46 °F). Nižšia alebo vyššia teplota okolia môže mať za následok nižšiu čistotu a výťažnosť cieľových buniek.

Ďalšie potrebné materiály

- **Vaky Cell Preparation Bag:**
  dva 600 mL transferové vaky vhodné na odstreďovanie, ako aj dve spojky miesta odberu vzoriek a dve súpravy na prenos plazmy na použitie počas postupov prípravy buniek
- **Vaky Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag:**
  deväť 600 mL transferových vakov vhodných na odstreďovanie
- **Medium Bag:**
  osem 600 mL transferových vakov vhodných na odstreďovanie
- **Cell Collection Bag (Part 2):**
  jeden 150 mL transferový vak vhodný na odstreďovanie v kombinácii s prepojovacou spojkou Luer/Spike Interconnector na pripojenie transferového vaku k súprave hadičiek
- jeden 100 mL vak na bunkovú kultúru priepustný pre plyn
- jeden Pre-System Filter
- zaisťovacie kliešte
- injekčné striekačky (rôznych veľkostí) a hypodermické ihly veľkosti 20 G
- ľudský sérový albumín (HSA) na pridanie do tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer na dosiahnutie finálnej koncentrácie 0,5 % (hmotn./obj.)
- skúmavky na vzorky
- 120 mL AB séra alebo, alternatívne, autológneho séra ako doplnok k používanému médiu
- 1 000 mL bunkového kultivačného média (RPMI 1640), +4 °C (+39 °F)
- 1 100 mL bunkového kultivačného média (RPMI 1640), +37 °C (+99 °F) doplneného o 10 % (hmotn./obj.) AB séra alebo, alternatívne, autológneho séra
- 500 mL bunkového kultivačného média (RPMI 1640, +4 °C (+39 °F) doplneného o 2 % (hmotn./obj.) AB séra alebo, alternatívne, autológneho séra

▶ Potrebné vybavenie

Informácie o vybavení potrebnom na separáciu buniek pomocou systému CliniMACS Plus sú uvedené v časti 4.7.

Ďalšie vybavenie potrebné pre príslušnú aplikáciu s použitím systému CliniMACS Plus CCS (IFN-gamma) System:

- 24-jamková kultivačná nádobka
- Separačná jednotka MiniMACS Separation Unit
- Stĺpce MS Columns
- Pre-Separation Filter (iba pre stĺpce MS Columns)
- MACSmix Tube Rotator

▶ Príprava vakov

Stanovte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag a vaku Cell Preparation Bag podľa opisu v časti 7.1.1 na strane 121.

Poznámka: Odstredivku predchlaďte na teplotu +4 °C (+39 °F). Po sekrečnej fáze je na rekombináciu bunkových suspenzií potrebný tretí vak Cell Preparation Bag. Preto označte jeden zo štyroch 600 mL transferových vakov (pripravených so 125 mL média (RPMI) doplneného o 10 % AB séra) ako **bunkový preparát č. 3 (separácia)**.

Príprava bunkového východiskového produktu

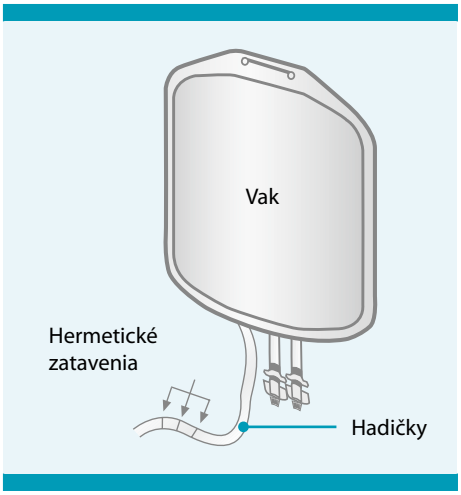
Nasledujúce časti opisujú odporúčaný postup prípravy bunkového východiskového produktu vo vaku pomocou sterilného hadičkového konektora.

- Operátor musí byť oboznámený s prevádzkou a používaním sterilného hadičkového konektora.
- Pred začatím postupu označovania a separácie buniek sa uistite, že máte k dispozícii všetky potrebné spotrebné materiály a vybavenie.

Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag č. 1.

1. Pred začatím prípravy bunkového východiskového produktu zaznamenajte dátum a čas začatia.
2. Stanovte objem pôvodného bunkového východiskového produktu odhadom 1 mL pôvodného produktu ako ekvivalentu 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Obidvoma rukami držte vak s bunkovým východiskovým produktom a jemným rotačným pohybom dôkladne premiešajte obsah.
4. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak Cell Preparation Bag č. 1 k vaku s bunkovým východiskovým produktom.
5. Otvorte zaisťovacie kliešte a preneste zodpovedajúcu hmotnosť bunkového východiskového produktu (obsahujúceho maximálne 1×10^9 buniek podľa vopred stanovenej frekvencie leukocytov) do vaku Cell Preparation Bag č. 1. Vizuálne skontrolujte (kontrolou váhy), či bola prenesená zodpovedajúca hmotnosť. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag.

6. Zatavte hadičky a oddeľte vaky, pričom na vaku Cell Preparation Bag č. 1 ponechajte aspoň 15 cm hadičky na ďalšie pripojenie (pozrite si Obrázok 6.1). Pomocou tepelného zatavovača vytvorte v hadičke tri samostatné zatavenia vedľa seba. Uistite sa, že sú zatavenia dôkladne vytvorené. Oddeľte v strednom zatavení. Vak, ktorý obsahoval bunkový východiskový produkt, si uchovajte, až kým sa nedokončí separácia a finálna analýza všetkých buniek.



Obrázok 6.1: Zatavenie vaku

7. Vyvážte váhu. Naplnený vak Cell Preparation Bag č. 1 umiestnite na váhu, pričom hadičku nechajte ležať na stole. Zaznamenajte hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag č. 1.

8. Stanovte hmotnosť bunkového východiskového produktu odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag č. 1 od hmotnosti vaku Cell Preparation Bag č. 1 naplneného pôvodným bunkovým východiskovým produktom. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť bunkového východiskového produktu (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag č. 1 (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag č. 1 (g)

Riedenie bunkového východiskového produktu

Bunkový východiskový produkt je potrebné zriediť kultivačným médiom. Zrieďte produkt studeným médiom (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) na celkový objem 500 mL. Vypočítajte hmotnosť média, ktoré sa má pridať, pomocou nasledujúcej rovnice a výsledok zaznamenajte.

Hmotnosť média, ktoré sa má pridať (g)	=	500 g	–	Hmotnosť zriedeného bunkového východiskového produktu (g)

1. Vezmite jeden z vakov na médium Medium Bag a pripojte ho k vaku Cell Preparation Bag č. 1 pomocou sterilného hadičkového konektora.

2. Na váhu umiestnite vak Cell Preparation Bag č. 1 a vyvážte váhu. Vak Medium Bag zaveste na vešiak na vaky.

3. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 1. Vizuálne sledujte stupnicu na váhe a vypočítanú hmotnosť média preneste do vaku Cell Preparation Bag č. 1.

4. Po prenesení zodpovedajúcej hmotnosti média zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 1, aby sa zastavil prietok kvapaliny.

5. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag č. 1 na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Medium Bag.
6. Obidvoma rukami držte vak Cell Preparation Bag č. 1 a jemným rotačným pohybom dôkladne premiešajte obsah. Vyhnite sa intenzívnemu miešaniu buniek.
7. Vyvážte váhu a odvážte naplnený vak Cell Preparation Bag č. 1. Zaznamenajte hmotnosť.
8. Stanovte hmotnosť zriedeného bunkového východiskového produktu odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag č. 1 od hmotnosti naplneného vaku Cell Preparation Bag č. 1. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť zriedeného bunkového východiskového produktu (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag č. 1 (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag č. 1 (g)

⚠ VAROVANIE

Riziko kontaminácie. Ak vaky nie sú vhodné na prípravu buniek alebo nie sú správne umiestnené do nádoby na odstreďovanie, existuje riziko kontaminácie v dôsledku poškodenia vaku. Používajte vhodné vaky, všetky voľné časti vakov alebo hadičiek sklopte smerom nadol, pričom dávajte pozor, aby ste neporušili celistvosť vakov, a vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nižšej účinnosti separácie buniek. Ak vaky nie sú správne umiestnené v nádobe na odstreďovanie, pri odstraňovaní supernatantu hrozí riziko straty buniek. Všetky voľné časti vakov alebo hadičiek sklopte smerom nadol a vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.

Odstreďovanie

1. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte prázdny vak Plasma Waste Bag č. 1 k vaku Cell Preparation Bag č. 1.
2. Všetky voľné časti vaku Cell Preparation Bag č. 1 alebo hadičiek sklopte smerom nadol. Oba vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.
3. Naplnenú nádobu vyvážte nádobou s vhodnou hmotnosťou. Je veľmi dôležité, aby bola odstredivka presne vyvážená.
4. Odstreďujte bunky pri 200 × g (bez brzdy) po dobu 10 minút pri izbovej teplote (+19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).
5. Vaky vyberte z odstredivky, pričom dávajte pozor, aby ste nenarušili bunkovú peletu. Vložte vak Cell Preparation Bag č. 1 na extraktor plazmy.

6. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 1. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste počas odstraňovania supernatantu neresuspendovali bunkovú peletu. Po odstránení supernatantu zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 1, aby sa zastavil prietok kvapaliny.
7. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag č. 1 na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Plasma Waste Bag č. 1.
8. Opakujte riedenie a odstreďovanie s použitím druhého vaku Medium Bag pripraveného so studeným médiom a vaku Plasma Waste Bag č. 2.
9. Vaky Plasma Waste Bag si uchovajte, až kým sa nedokončí separácia a finálna analýza všetkých buniek.

Úprava objemu

1. Na *in vitro* opätovnú stimuláciu buniek sa musí objem vzorky buniek upraviť na 100 mL. Po odstránení supernatantu peletu opatrne resuspendujte.
2. Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag č. 1 pridaním kultivačného média. Vypočítajte hmotnosť média, ktoré sa má pridať, pomocou nasledujúcej rovnice:

Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag č. 1 po úprave objemu (g)	=	100 g	+	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag č. 1 (g)

3. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak Cell Preparation Bag č. 1 k pripravenému vaku Medium Bag 10 % (obsahujúcemu 600 mL vopred ohriateho kultivačného média doplneného o 10 % AB séra). Vak Medium Bag 10 % zaveste na vešiak na vaky.
4. Vyvážte váhu. Na váhu umiestnite vak Cell Preparation Bag č. 1 s bunkovou peletou.
5. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 1. Naplňte vak Cell Preparation Bag č. 1 médiom, kým nedosiahnete vypočítanú „hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag č. 1 po úprave objemu“. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 1, aby sa zastavil prietok kvapaliny.
6. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Medium Bag 10 %.
7. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak Cell Preparation Bag č. 1 k 100 mL kultivačnému vaku priepustnému pre plyn. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 1 a obsah kompletne preneste.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nižšej účinnosti. Ak vaky nie sú vhodné na prípravu buniek, existuje riziko kontaminácie v dôsledku poškodenia vaku. Používajte kultivačné vaky priepustné pre plyn, ktoré sú vhodné na prípravu buniek.

Označovanie buniek

Jeden systém CliniMACS Cytokine Capture System (IFN-gamma) obsahujúci dve liekovky (každá s objemom 7,5 mL) je pripravený na použitie a postačuje na jednu aplikáciu, ako sa to uvádza nižšie. Činidlá nie sú určené na parenterálne podanie.

Cieľová vzorka a kontrolná vzorka

Protokol opisuje postup označenia „cieľovej vzorky“ a „kontrolnej vzorky“. Obe vzorky sa spracúvajú paralelne, pričom kontrolná vzorka sa spracúva rovnako ako cieľová vzorka, avšak bez pridania antigénu. Z tohto dôvodu analýza kontrolnej vzorky poskytuje informácie o spontánnej sekrécii cytokínov.

In vitro opätovná stimulácia

DÔLEŽITÉ

- Malá negatívna kontrolná vzorka (kontrolná vzorka), ktorá je ošetrená rovnako ako cieľová vzorka stimulovaná antigénom, avšak bez pridania antigénu, by mala byť zahrnutá ako miera spontánnej sekrécie cytokínov.
- Optimálna hustota buniek na *in vitro* opätovnú stimuláciu je 0,5 – 1×10^9 buniek/cm^2 a 1×10^9 buniek/mL.

1. Pomocou sterilnej injekčnej striekačky (1 mL) s ihlou veľkosti 20 G odoberte malý alikvotný podiel (napr. 1 mL = pribl. 1×10^9 buniek) buniek, ktorý poslúži ako **kontrolná vzorka (nestimulovaná)**.
2. Alikvotný podiel kultivujte za optimálnych podmienok v jednej jamke 24-jamkovej kultivačnej nádobky.
3. Pomocou injekčnej striekačky vstreknite do bunkového kultivačného vaku priepustného pre plyn **(cieľová vzorka)** cez jeden z portov antigén s vopred stanovenou koncentráciou.
4. Obe vzorky inkubujte pri teplote +37 °C (+99 °F) a 5 – 7,5 % CO^2 po vhodnú dobu v inkubátore. Ak boli ako antigény použité proteíny alebo bunkové lyzáty, inkubačná doba bude 4 až 16 hodín. V prípade peptidov je inkubačná doba 3 až 6 hodín. Keďže optimálna doba stimulácie je ovplyvnená špecifickými vlastnosťami antigénu, spoločnosť Miltenyi Biotec odporúča vykonať osobitné validačné postupy na dosiahnutie čo najlepšieho výsledku.

Označenie činidlom CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent

Zaznamenajte číslo šarže a dátum najneskoršej spotreby činidla CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent.

Cieľová vzorka

DÔLEŽITÉ

Pri sekrečnej fáze musí mať zvolený vak dostatočnú veľkosť, aby na konci sekrečnej fázy umožnil pridanie aspoň 1 objemu studeného tlmivého roztoku. Hustota buniek nesmie prekročiť 1×10^6 buniek/mL. Preto je potrebné inkubovať 1×10^9 buniek na sekréciu v celkom objeme 1 000 mL teplého kultivačného média.

1. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte kultivačný vak Cell Preparation Bag č. 2 (sekrécia) a preneste bunky. Zaistite kompletný prenos buniek do vaku Cell Preparation Bag č. 2. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 2, aby sa zastavil prietok kvapaliny.
2. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag č. 2 na ďalšie pripojenie. Odpojte prázdny kultivačný vak.
3. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte pripravený vak Medium Bag 2 % (obsahujúci 500 mL studeného (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) kultivačného média doplneného o 2 % AB séra) k vaku Cell Preparation Bag č. 2.
4. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 2. Naplňte vak Cell Preparation Bag č. 2 na max. 600 mL. Po prenesení zodpovedajúcej hmotnosti média zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 2, aby sa zastavil prietok kvapaliny.
5. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag č. 2 na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Medium Bag 2 %.
6. Pomocou tepelného zatavovača pripojte prázdny vak Wash Waste Bag č. 1 k vaku Cell Preparation Bag č. 2.
7. Všetky voľné časti vaku alebo hadičiek sklopte smerom nadol. Oba vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.
8. Naplnenú nádobu vyvážte nádobou s vhodnou hmotnosťou. Je veľmi dôležité, aby bola odstredivka presne vyvážená.
9. Odstreďujte bunky pri 300 × g (bez brzdy) po dobu 10 minút pri teplote +4 až +8 °C (+39 až +46 °F).
10. Umiestnite vak Cell Preparation Bag č. 2 na extraktor plazmy. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 2. Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste neporušili bunkovú peletu. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 2, aby sa zastavil prietok kvapaliny.
11. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag č. 2 na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Wash Waste Bag č. 1.
12. Po odstránení supernatantu bunkovú peletu resuspendujte v zvyškovom objeme.

13. K vaku Cell Preparation Bag č. 2 pripevnite spojku miesta odberu vzoriek a dezinfikujte membránu. Pomocou vhodnej sterilnej injekčnej striekačky a ihly odoberte 7,425 mL z liekovky činidla CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent. Na odstránenie obsahu jednej liekovky činidla postačí 10 mL injekčná striekačka. Injekčná striekačka by mala byť vybavená ihlou veľkosti 20 G.
14. Obidvoma rukami držte vak Cell Preparation Bag č. 2 a jemným rotačným pohybom dôkladne premiešajte obsah.
15. Pomocou injekčného portu na spojke miesta odberu vzoriek vstreknite celý objem činidla do vaku Cell Preparation Bag č. 2. Dávajte pritom pozor, aby ste vak neprepichli.
16. Bunky resuspendujte a inkubujte po dobu 5 minút na ľade. Zaznamenajte inkubačnú dobu.

Kontrolná vzorka (nestimulovaná)

1. Preneste bunky do 15 mL uzatvárateľnej skúmavky.
2. Pridajte studené (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) kultivačné médium doplnené o 2 % AB séra do objemu 15 mL.
3. Odstreďujte bunky pri 300 × g (bez brzdy) po dobu 10 minút pri izbovej teplote +4 až +8 °C (+39 až +46 °F) a supernatant úplne odstráňte.
4. Resuspendujte bunkovú peletu v 100 µL studeného (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) kultivačného média doplneného o 2 % AB séra.
5. Pridajte zvyšných 75 µL činidla CliniMACS IFN-gamma Catchmatrix Reagent a inkubujte suspenziu po dobu 5 minút na ľade.

Sekrečná fáza

Cieľová vzorka

1. Zoberte štyri naplnené transferové vaky (vrátane označeného vaku Cell Preparation Bag č. 3) obsahujúce 125 mL teplého (+37 °C [+99 °F]) kultivačného média doplneného o 10 % AB séra.
2. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak Cell Preparation Bag č. 2 k pripravenému vaku Medium Bag 10 % (obsahujúcemu vopred ohriate (+37 °C [+99 °F]) kultivačné médium doplnené o 10 % AB séra).
3. Pridajte 500 mL vopred ohriateho kultivačného média do vzorky buniek vo vaku Cell Preparation Bag č. 2. Okamžite začnite merať inkubačnú dobu trvajúcu 45 minút.
4. Do každého zo štyroch transferových vakov rozdeľte 125 mL výslednej bunkovej suspenzie tak, že pomocou sterilného hadičkového konektora pripojíte transferové vaky do série k vaku Cell Preparation Bag č. 2. Vizuálne sledujte stupnicu na váhe a preneste zodpovedajúcu hmotnosť bunkovej suspenzie. Výsledkom tohto postupu je získanie celkovo 250 g bunkovej suspenzie v každom zo štyroch transferových vakov. Po prenose zatavte hadičky pomocou tepelného zatavovača, aby ste odpojili transferové vaky.

5. Inkubujte bunky pri teplote +37 °C (+99 °F) po zvyšok 45-minútového intervalu pri neustálom pomalom otáčaní (max. 50 otáčok za minútu) až do konca inkubačnej doby. Zaznamenajte inkubačnú dobu.

6. Zoberte súpravu na prenos plazmy a uistite sa, že je svorka v uzavretej polohe. Zasuňte hrot súpravy na prenos plazmy do portu vaku na tlmivý roztok.

7. Po 45 minútach pripojte pomocou sterilného hadičkového konektora vak na tlmivý roztok k vaku Cell Preparation Bag č. 3. Pridajte studený (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) tlmivý roztok do každého zo štyroch transferových vakov (aspoň jeden objem, t. j. 250 mL každý) tak, že pripojíte transferové vaky do série k vaku na tlmivý roztok. Bunky nechajte vychladnúť uložením vakov na ľad na dobu 10 minút.

8. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte ku každému zo štyroch transferových vakov jeden vak Wash Waste Bag (vaky Wash Waste Bag č. 2 až 5).

9. Odstreďujte bunky pri 300 × g (bez brzdy) po dobu 10 minút pri teplote +4 °C (+39 °F). Pomocou extraktora plazmy úplne odstráňte supernatant zo všetkých vakov.

10. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky každého vaku. Odpojte vaky Wash Waste Bag.

11. Zoberte súpravu na prenos plazmy a uistite sa, že je svorka v uzavretej polohe. Zasuňte hrot súpravy na prenos plazmy do portu vaku na tlmivý roztok.

12. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak na tlmivý roztok k vaku Cell Preparation Bag č. 3.

13. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do otvorenej polohy a vak Cell Preparation Bag č. 3 naplňte 200 mL tlmivého roztoku.

14. Po prenesení príslušnej hmotnosti tlmivého roztoku posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do uzavretej polohy, aby sa zastavil prietok kvapaliny.

15. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag č. 3. Odpojte vak na tlmivý roztok.

16. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte jeden z ďalších troch transferových vakov obsahujúcich bunky k vaku Cell Preparation Bag č. 3 a obe suspenzie rekombinujte.

    DÔLEŽITÉ
    Rozdelené vzorky sa musia pred odstredením rekombinovať vo vaku Cell Preparation Bag č. 3.

17. Opakujte tento postup, až kým sa bunkové suspenzie zo všetkých štyroch transferových vakov nerekombinujú vo vaku Cell Preparation Bag č. 3.

18. Po rekombinovaní buniek pripojte pomocou sterilného hadičkového konektora vak na tlmivý roztok k vaku Cell Preparation Bag č. 3.

19. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do otvorenej polohy. Naplňte vak Cell Preparation Bag tlmivým roztokom na max. 500 mL.

20. Po prenesení príslušnej hmotnosti tlmivého roztoku posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do uzavretej polohy, aby sa zastavil prietok kvapaliny. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 3.
21. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky medzi oboma svorkami, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag č. 3 na ďalšie pripojenie. Odpojte vak na tlmivý roztok.
22. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte prázdny vak Wash Waste Bag č. 6 k vaku Cell Preparation Bag č. 3.
23. Všetky voľné časti vaku Cell Preparation Bag č. 3 alebo hadičiek sklopte smerom nadol. Oba vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.
24. Naplnenú nádobu vyvážte nádobou s vhodnou hmotnosťou. Je veľmi dôležité, aby bola odstredivka presne vyvážená.
25. Odstreďujte bunky pri 300 × g (bez brzdy) po dobu 10 minút pri teplote +4 °C (+39 °F).

Kontrolná vzorka (nestimulovaná)

1. Pridajte teplé (+37 °C [+99 °F]) kultivačné médium doplnené o 10 % AB sérum na zriedenie vzorky na maximálne 1×10^6 buniek/mL, t. j. na 1×10^9 buniek sa musí použiť celkový objem 10 mL.
2. Inkubujte bunky v uzavretej skúmavke po dobu 45 minút pri teplote +37 °C (+99 °F) pri neustálom pomalom otáčaní (max. 50 otáčok za minútu) pomocou rotátora MACSmix Tube Rotator.
3. Po 45 minútach naplňte skúmavku studeným (+4 °C [+39 °F]) tlmivým roztokom a skúmavku umiestnite na dobu 5 – 10 minút na ľad.
4. Odstreďujte bunky pri 300 × g (bez brzdy) po dobu 10 minút pri teplote +4 až +8 °C (+39 až +46 °F).

Magnetické označovanie buniek činidlom CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent

Zaznamenajte číslo šarže a dátum najneskoršej spotreby činidla CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.

Cieľová vzorka

1. Po kroku odstreďovania supernatant opatrne odstráňte pomocou extraktora plazmy podľa opisu vyššie a resuspendujte vo zvyšnom objeme. Po odstránení zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 3.
2. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag č. 3 na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Wash Waste Bag č. 6.

3. K vaku Cell Preparation Bag č. 3 pripevnite spojku miesta odberu vzoriek a dezinfikujte membránu. Pomocou vhodnej sterilnej injekčnej striekačky a ihly odoberte 7,425 mL z liekovky činidla CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent. Na odstránenie obsahu jednej liekovky činidla postačí 10 mL injekčná striekačka. Injekčná striekačka by mala byť vybavená ihlou veľkosti 20 G.
4. Pomocou injekčného portu na spojke miesta odberu vzoriek vstreknite činidlo do vaku Cell Preparation Bag č. 3. Dávajte pritom pozor, aby ste vak neprepichli. Okamžite začnite merať inkubačnú dobu trvajúcu 15 minút. Zaznamenajte čas začatia inkubácie.
5. Obidvoma rukami držte vak Cell Preparation Bag a jemným rotačným pohybom dôkladne premiešajte obsah.
6. Bunky inkubujte po dobu 15 minút na ľade. Zaznamenajte čas zastavenia inkubácie.
7. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak na tlmivý roztok k vaku Cell Preparation Bag č. 3.
8. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 3. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do otvorenej polohy. Naplňte vak Cell Preparation Bag č. 3 na max. 500 mL studeným (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) tlmivým roztokom.
9. Po prenesení príslušnej hmotnosti tlmivého roztoku posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do uzavretej polohy. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag č. 3. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky medzi oboma svorkami. Odpojte vak na tlmivý roztok.
10. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte prázdny vak Wash Waste Bag č. 7 k vaku Cell Preparation Bag č. 3.
11. Všetky voľné časti vaku alebo hadičiek sklopte smerom nadol. Oba vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.
12. Naplnenú nádobu vyvážte nádobou s vhodnou hmotnosťou. Je veľmi dôležité, aby bola odstredivka presne vyvážená.
13. Odstreďujte pri 300 × g (bez brzdy) po dobu 10 minút pri teplote +4 °C (+39 °F).
14. Opatrne odstráňte supernatant podľa opisu vyššie a resuspendujte bunky v 100 mL studeného (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) tlmivého roztoku.
15. Dezinfikujte membránu spojky miesta odberu vzoriek. Zasuňte ihlu s vhodnou injekčnou striekačkou do spojky miesta odberu vzoriek na vaku Cell Preparation Bag a odoberte objem 0,5 mL označeného produktu. Dávajte pritom pozor, aby ste vak neprepichli. Preneste vzorku do skúmavky na vzorky. Označte skúmavku ako PÔVODNÁ CIEĽOVÁ VZORKA (mala by obsahovať identifikačné údaje pacienta).

    DÔLEŽITÉ

    Pred odberom vzorky sa uistite, či sú bunky dôkladne premiešané. Na získanie reprezentatívnej vzorky použite injekčnú striekačku s objemom najmenej 5 mL.

16. Uchovajte vzorku buniek na analýzu buniek v chlade (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]).

Kontrolná vzorka (nestimulovaná)

1. Po odstredení supernatant opatrne odstráňte.
2. Resuspendujte bunky v 100 mL studeného tlmivého roztoku (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]).
3. Pridajte zvyšných 75 µL činidla CliniMACS IFN-gamma Enrichment Reagent.
4. Bunky inkubujte po dobu 15 minút na ľade.
5. Vak naplňte studeným tlmivým roztokom (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) a odstreďujte pri 300 × g (bez brzdy) po dobu 10 minút pri teplote +4 °C (+39 °F).
6. Opatrne odstráňte supernatant a resuspendujte bunky v 1 mL studeného (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) tlmivého roztoku.
7. Odoberte malú vzorku (pribl. 100 µL) bunkovej suspenzie a pred separáciou ju preneste do skúmavky označenej ako frakcia PÔVODNÁ CIEĽOVÁ VZORKA. Až do analýzy uchovávajte v chlade.

Magnetická separácia

Cieľová vzorka

Magnetická separácia cieľovej vzorky sa vykonáva pomocou prístroja CliniMACS Plus Instrument. Po postupe separácie spracujte kontrolnú vzorku podľa opisu uvedeného nižšie.

Kontrolná vzorka (nestimulovaná)

1. Pripravte dva stĺpce MS Columns tak, že ich opláchnete v 500 µL studeného (+2 až +8 °C [+36 až +46 °F]) tlmivého roztoku a odpadový roztok zlikvidujete.
2. Prvý stĺpec vložte do magnetického poľa separátora MiniMACS Separator.
3. Bunky nechajte prejsť cez predseparačný filter, aby sa odstránili zhluky.
4. Naneste bunkovú suspenziu na stĺpec.
5. Odoberte všetok odpadový roztok (obsahujúci neoznačenú bunkovú frakciu). Premyte stĺpec pridaním 500 µL studeného tlmivého roztoku na stĺpec. Po vyprázdnení zásobníka stĺpca vykonajte celkom tri premývacie kroky postupným nanesením 500 µL tlmivého roztoku na stĺpec.
6. Vyberte stĺpec zo separátora, vložte do separátora druhý stĺpec a prvý stĺpec položte na hornú časť druhého stĺpca.
7. Na prvý stĺpec napipetujte 1 mL studeného tlmivého roztoku. Frakciu s magneticky označenými bunkami okamžite vypláchnite pevným priložením plunžra dodaného so stĺpcom priamo na druhý stĺpec.
8. Odoberte neoznačené bunky, ktoré prešli cez stĺpec, a umyte stĺpec 500 µL studeného tlmivého roztoku. Po vyprázdnení zásobníka stĺpca vykonajte celkom tri premývacie kroky postupným nanesením 500 µL tlmivého roztoku na stĺpec.

9. Vyberte druhý stĺpec zo separátora a vložte stĺpec na vhodnú odberovú skúmavku označenú ako pozitívna frakcia.
10. Na stĺpec napipetujte 0,5 mL studeného tlmivého roztoku. Frakciu s magneticky označenými bunkami okamžite vypláchnite pevným priložením plunžra dodaného so stĺpcom.
11. Až do analýzy uchovávajte frakciu cieľových buniek v chlade.

6.17.2 KROK 2: Výber separačného programu

- **Výber separačného programu ENRICHMENT 3.2**

Pozrite si časť 7.2.4 na strane 142.

6.17.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

- **Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS**

Pozrite si časť 7.3.1 na strane 156.

6.17.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

- **Postup separácie**
- **Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu**
- **Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie**
- **Analýza buniek**

Pozrite si časť 7.4.3 na strane 199.

7 Podrobné vysvetlenie KROKOV 1 – 4

7.1 KROK 1: Príprava buniek a magnetické označovanie

V tejto kapitole sú podrobne vysvetlené postupy, ktoré sú potrebné na separáciu buniek pomocou systému CliniMACS Plus.

7.1.1 Prvé vyžadované činnosti

Materiály potrebné pre konkrétnu aplikáciu sú uvedené v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu (pozrite si časť 5.2 na strane 37).

Príprava tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Doplňte tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

Príprava vakov

Informácie týkajúce sa potrebných vakov sú uvedené v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu:

- **Cell Preparation Bag:** Do vonkajšieho portu vaku Cell Preparation Bag vložte spojku miesta odberu vzoriek (alebo ekvivalentný produkt). Na hadičku blízko vaku nasaďte zaisťovacie kliešte a zatvorte ich. Odvážte prázdny vak Cell Preparation Bag so zaisťovacími kliešťami umiestnenými blízko vaku a hadičkou zavesenou vedľa váhy na stole. Zaznamenajte hmotnosť.

  DÔLEŽITÉ
  Vzhľadom na to, že dĺžka hadičky sa môže počas postupu prípravy líšiť, pri určovaní hmotnosti vaku Cell Preparation Bag buďte pozorní. Na získanie presnej hodnoty skontrolujte, či sú zaisťovacie kliešte vždy umiestnené v blízkosti vaku a položené na váhe a či zvyšok hadičky leží vedľa váhy na stole.

- **Cell Collection Bag:**
  - CliniMACS Tubing Set/CliniMACS Tubing Set LS: Do vonkajšieho portu vaku Cell Collection Bag vložte spojku Luer/Spike Interconnector (alebo ekvivalentný produkt). Na hadičku blízko vaku nasaďte zaisťovacie kliešte a zatvorte ich. Odvážte prázdny vak Cell Collection Bag so zaisťovacími kliešťami umiestnenými blízko vaku a hadičkou zavesenou vedľa váhy na stole. Zaznamenajte hmotnosť.
  - CliniMACS Depletion Tubing Set: Jeden vak Cell Collection Bag už je pripojený k súprave hadičiek. Do vonkajšieho portu vaku Cell Collection Bag vložte spojku Luer/Spike Interconnector (alebo ekvivalentný produkt). Na hadičku blízko vaku nasaďte zaisťovacie kliešte a zatvorte ich. Odvážte prázdny vak Cell Collection Bag so zaisťovacími kliešťami umiestnenými blízko vaku a hadičkou zavesenou vedľa váhy na stole. Zaznamenajte hmotnosť.

7.1.2 Magnetické označovanie buniek

Nasledujúce časti opisujú odporúčaný postup prípravy bunkového produktu vo vnútri vaku pomocou sterilného hadičkového konektora.

- Operátor musí byť oboznámený s prevádzkou a používaním sterilného hadičkového konektora.
- Pred začatím postupu označovania a separácie buniek sa uistite, že máte k dispozícii všetky potrebné spotrebné materiály a vybavenie.

DÔLEŽITÉ

- Všetka manipulácia s vakmi sa musí vykonávať v sterilných podmienkach použitím aseptických postupov (napr. v digestore s laminárnym prúdením). Pripojenie hadičiek pomocou sterilného hadičkového konektora sa môže vykonávať mimo digestora s laminárnym prúdením.
- Prípravu vzorky a separáciu buniek vykonávajte v teplotných podmienkach definovaných v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu. Nižšia alebo vyššia teplota okolia bude mať za následok nižšiu čistotu a výťažnosť cieľových buniek.

Stručne povedané, magnetické označenie bunkového produktu sa vykonáva pomocou nasledujúcich krokov:

1. analýza bunkového východiskového produktu
2. prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag
3. riedenie bunkového východiskového produktu
4. odstreďovanie
5. len pre systémy CliniMACS Plus Anti-Biotin a systémy CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin: označenie buniek (inkubácia s primárnou protilátkou/CliniMACS TCRα/β-Biotin) a odstránenie prebytočného konjugátu (1. premytie)
6. úprava objemu
7. len pre systémy CliniMACS Plus CD3 a CD3/CD19 System: inkubácia s imunoglobulínom na klinické použitie
8. magnetické označenie buniek (inkubácia s činidlom CliniMACS)
9. odstránenie prebytočného činidla
10. úprava objemu na separáciu buniek

Analýza bunkového východiskového produktu

Pred začatím prípravy bunkového východiskového produktu stanovte nasledujúce parametre:

- celkový počet leukocytov,
- percento buniek, ktoré sa majú označiť,
- celkový počet leukocytov, ktoré sa majú označiť,
- životaschopnosť.

Zaistite spracovanie v rámci špecifikácie aplikácie.

Po skončení postupu označenia prekontrolujte parametre. To je potrebné pre programy postupného nakladania (ENRICHMENT 1.1/DEPLETION 2.1/ DEPLETION 3.1), pretože pri nastavovaní prístroja CliniMACS Plus Instrument pred vložením súpravy hadičiek do prístroja je potrebné do softvéru zadať nasledujúce tri parametre vzorky:

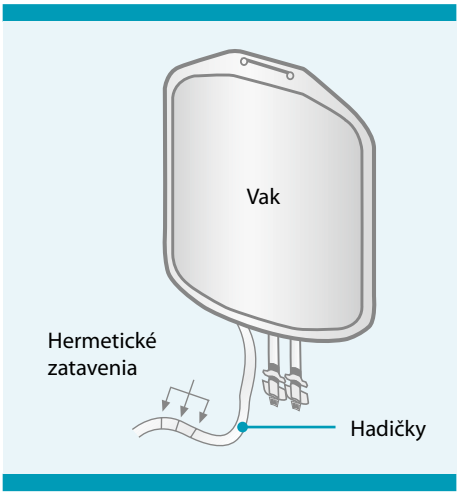
- koncentrácia leukocytov na mL,
- percento buniek, ktoré sa majú označiť,
- finálny objem vzorky buniek (objem nakladanej vzorky).

V závislosti od zamýšľaného použitia buniek (napr. počet T-buniek, fenotyp) sa môžu vyžadovať ďalšie testy. Zaznamenajte všetky údaje.

Prenos bunkového východiskového produktu do vaku Cell Preparation Bag

1. Pred začatím prípravy bunkového východiskového produktu zaznamenajte dátum a čas začatia.
2. Stanovte objem bunkového východiskového produktu na základe predpokladu, že 1 mL produktu zodpovedá 1 g (1 g ≙ 1 mL).
3. Obidvoma rukami držte vak s bunkovým východiskovým produktom a jemným otáčavým pohybom dôkladne premiešajte obsah.
4. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak Cell Preparation Bag k pôvodnému vaku s bunkovým východiskovým produktom.
5. Otvorte zaisťovacie kliešte a preneste bunkový východiskový produkt do vaku Cell Preparation Bag. Pomocou vytláčačky hadičiek očistite hadičky od zvyškov krvi. Uzatvorte zaisťovacie kliešte na hadičkách čo najbližšie k vaku.

6. Zatavte hadičky a oddeľte vaky, pričom na vaku Cell Preparation Bag ponechajte aspoň 15 cm hadičky na ďalšie pripojenie (pozrite si Obrázok 7.1). Pomocou tepelného zatavovača vytvorte v hadičke tri samostatné zatavenia vedľa seba. Uistite sa, že sú zatavenia dôkladne vytvorené. Oddeľte v strednom zatavení. Pôvodný vak na leukaferézu/bunkový východiskový vak si uchovajte, až kým sa nedokončí separácia a finálna analýza všetkých buniek.



Obrázok 7.1: Zatavenie vaku.

7. Na odobratie vzorky dezinfikujte membránu spojky miesta odberu vzoriek. Obsah vaku premiešajte. Zasuňte ihlu s vhodnou injekčnou striekačkou do spojky miesta odberu vzoriek na vaku Cell Preparation Bag a odoberte objem 0,5 mL. Preneste vzorku do skúmavky na vzorky. Označte skúmavku ako LEUKAFERÉZA/BUNKOVÝ VÝCHODISKOVÝ PRODUKT (mala by obsahovať identifikačné údaje pacienta) a uchovajte na analýzu buniek.

DÔLEŽITÉ

Pred odberom vzorky sa uistite, či je bunkový východiskový produkt dôkladne premiešaný. Na získanie reprezentatívnej vzorky použite injekčnú striekačku s objemom najmenej 5 mL.

8. Vyvážte váhu. Naplnený vak Cell Preparation Bag umiestnite na váhu, pričom hadičku nechajte ležať na stole. Zaznamenajte hmotnosť.

9. Stanovte hmotnosť bunkového východiskového produktu odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti vaku Cell Preparation Bag naplneného bunkovým východiskovým produktom. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť bunkového východiskového produktu (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag (g)

Riedenie bunkového východiskového produktu

Informácie týkajúce sa potrebného pomeru riedenia sú uvedené v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu.

Bunkový východiskový produkt je potrebné pred magnetickým označením zriediť tlmivým roztokom CliniMACS PBS/EDTA Buffer (doplneným o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.). Vypočítajte hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať, pomocou jednej z nasledujúcich rovníc (1 alebo 2) v závislosti od aplikácie a vypočítanú hmotnosť zaznamenajte.

(1) Hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať (g)	=	600 g	–	Hmotnosť bunkového východiskového produktu (g)
(2) Hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať (g)	=	Hmotnosť bunkového východiskového produktu (g)	×	2

1. Zoberte súpravu na prenos plazmy a zaistite, aby bola svorka v uzavretej polohe. Zasuňte hrot súpravy na prenos plazmy do portu vaku na tlmivý roztok.
2. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak na tlmivý roztok k vaku Cell Preparation Bag. Vak na tlmivý roztok zaveste na vešiak na vaky.
3. Na váhu umiestnite vak Cell Preparation Bag a vyvážte váhu.
4. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do otvorenej polohy. Vizuálne sledujte stupnicu na váhe a vypočítanú hmotnosť tlmivého roztoku preneste do vaku Cell Preparation Bag.
5. Po prenesení príslušnej hmotnosti tlmivého roztoku posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do uzavretej polohy, aby sa zastavil prietok kvapaliny. Uzatvorte zaisťovacie kliešte na hadičkách čo najbližšie k vaku.
6. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky medzi svorkou a zaisťovacími kliešťami, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag na ďalšie pripojenie. Odpojte vak na tlmivý roztok.
7. Obidvoma rukami držte vak Cell Preparation Bag a jemným rotačným pohybom dôkladne premiešajte obsah. Vyhnite sa intenzívnemu miešaniu buniek.
8. Vyvážte váhu a odvážte naplnený vak Cell Preparation Bag. Zaznamenajte hmotnosť.
9. Stanovte hmotnosť zriedeného bunkového východiskového produktu odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplneného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť zriedeného bunkového východiskového produktu (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag (g)

Odstreďovanie

⚠ VAROVANIE

Riziko kontaminácie. Ak vaky nie sú vhodné na prípravu buniek alebo nie sú správne umiestnené do nádoby na odstreďovanie, existuje riziko kontaminácie v dôsledku poškodenia vaku. Používajte vhodné vaky, všetky voľné časti vakov alebo hadičiek sklopte smerom nadol, pričom dávajte pozor, aby ste neporušili celistvosť vakov, a vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko nižšej účinnosti separácie buniek. Ak vaky nie sú správne umiestnené v nádobe na odstreďovanie, pri odstraňovaní supernatantu hrozí riziko straty buniek. Všetky voľné časti vakov alebo hadičiek sklopte smerom nadol a vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.

1. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte prázdny vak Plasma Waste Bag k vaku Cell Preparation Bag.
2. Všetky voľné časti vaku Cell Preparation Bag alebo hadičiek sklopte smerom nadol. Oba vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.
3. Naplnenú nádobu vyvážte nádobou s vhodnou hmotnosťou. Je veľmi dôležité, aby bola odstredivka presne vyvážená.
4. Odstreďujte bunky za podmienok definovaných v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu. Zaznamenajte podmienky odstreďovania.
5. Vaky vyberte z odstredivky, pričom dávajte pozor, aby ste nenarušili bunkovú peletu. Umiestnite vak Cell Preparation Bag na extraktor plazmy a pripojený odpadový vak na stolovú váhu.

Úprava objemu

Pri magnetickom označovaní buniek sa optimálna hmotnosť bunkového produktu líši v závislosti od aplikácie. Pozrite si objem označovania v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu.

V závislosti od aplikácie môže byť potrebné buď odstrániť iba určité množstvo supernatantu, aby sa dosiahol objem označovania (odstránenie supernatantu prispôsobené na mieru), alebo úplne odstrániť supernatant a pridať tlmivý roztok, aby sa dosiahol objem označovania (úplné odstránenie supernatantu). Pozrite si príslušnú možnosť uvedenú v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu a pokračujte podľa nej.

DÔLEŽITÉ

- Pomocou separátora plazmy majte neustále pod kontrolou uvoľňovaciu rukoväť extraktora a pred začatím prenosu sa uistite, že sú otvorené zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag. Rukoväť extraktora uvoľňujte pomaly.
- Počas odstraňovania supernatantu buďte opatrní, aby nedošlo k strate buniek.

Odstránenie supernatantu prispôsobené na mieru

Pomocou nasledujúcej rovnice vypočítajte hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť, aby ste vzorku upravili na objem označovania:

Hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť (g)	=	Hmotnosť bunkového produktu po premytí (g)	–	Objem označovania (g)

Zaznamenajte hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť.

1. Na váhu umiestnite vak Plasma Waste Bag alebo Wash Waste Bag č. 1 a vyvážte váhu.
2. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag. Vizuálne sledujte stupnicu na váhe a pomocou extraktora plazmy odstráňte supernatant. Prebytočný supernatant opatrne vytláčajte, až pokým nedosiahnete vypočítanú „hmotnosť supernatantu, ktorý sa má odstrániť".
3. Po odstránení zodpovedajúcej hmotnosti supernatantu zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag, aby sa zastavil prietok kvapaliny. Zaznamenajte hmotnosť odstráneného supernatantu.
4. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Plasma Waste Bag alebo Wash Waste Bag č. 1.
5. Opatrne resuspendujte bunky vo vaku Cell Preparation Bag. Vyhnite sa intenzívnemu miešaniu buniek. Uistite sa, že sú resuspendované všetky bunky.
6. Vyvážte váhu a odvážte naplnený vak Cell Preparation Bag. Zaznamenajte hmotnosť.
7. Stanovte hmotnosť bunkového produktu po úprave objemu odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplneného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť bunkového produktu po úprave objemu (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag (g)

8. Vaky Plasma Waste Bag and Wash Waste Bag si uchovajte, až kým sa nedokončí finálna separácia a analýza všetkých buniek.

Úplné odstránenie supernatantu

Supernatant úplne odstráňte, pričom dávajte pozor, aby ste počas odstraňovania supernatantu neresuspendovali bunkovú peletu. Po odstránení supernatantu zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag, aby sa zastavil prietok kvapaliny. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Plasma Waste Bag. Peletu opatrne resuspendujte.

Upravte hmotnosť vaku Cell Preparation Bag pridaním tlmivého roztoku. Vypočítajte cieľovú hmotnosť vaku Cell Preparation Bag (CPB) naplneného zriedeným bunkovým produktom pomocou nasledujúcej rovnice:

Cieľová hmotnosť vaku CPB naplneného premytým bunkovým produktom (g)	=	Objem označovania (g)	+	Hmotnosť prázdneho vaku CPB (g)

1. Zasuňte hrot súpravy na prenos plazmy do portu vaku na tlmivý roztok. Skontrolujte, či je svorka na súprave na prenos plazmy v uzavretej polohe.
2. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak na tlmivý roztok k vaku Cell Preparation Bag. Vak na tlmivý roztok zaveste na vešiak na vaky.
3. Vyvážte váhu. Na váhu umiestnite vak Cell Preparation Bag s bunkovou peletou.
4. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do otvorenej polohy. Naplňte vak Cell Preparation Bag tlmivým roztokom, až kým sa nedosiahne vypočítaná „cieľová hmotnosť vaku Cell Preparation Bag naplneného bunkovým produktom“. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do uzavretej polohy, aby sa zastavil prietok kvapaliny. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag.
5. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag na ďalšie pripojenie. Odpojte vak na tlmivý roztok.
6. Opatrne resuspendujte bunky vo vaku Cell Preparation Bag. Vyhnite sa intenzívnemu miešaniu buniek. Uistite sa, že sú resuspendované všetky bunky.
7. Vyvážte váhu a odvážte naplnený vak Cell Preparation Bag. Zaznamenajte hmotnosť.
8. Stanovte hmotnosť bunkového produktu po úprave objemu odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplneného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť bunkového produktu po úprave objemu (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag (g)

9. Vak Plasma Waste Bag si uchovajte, až kým sa nedokončí separácia a finálna analýza všetkých buniek.

Označenie buniek (len pre systémy CliniMACS Plus Anti-Biotin a systémy CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin)

Inkubácia s činidlom CliniMACS TCRα/β-Biotin

Liekovka s činidlom CliniMACS TCRα/β-Biotin je pripravená na použitie a postačuje na aplikáciu podľa opisu uvedeného nižšie. Konjugát nie je určený na parenterálne podanie:

Konjugát skladujte pri teplote +2 až +8 °C (+36 až +46 °F). NEUCHOVÁVAJTE mrazničke. Konjugát sa musí používať studený priamo z chladničky. Pred použitím NEZAHRIEVAJTE. Číslo šarže a dátum najneskoršej spotreby konjugátu sú vytlačené na štítku liekovky. NEPOUŽÍVAJTE konjugát po dátume najneskoršej spotreby.

1. Zaznamenajte číslo šarže a dátum najneskoršej spotreby činidla CliniMACS TCRα/β-Biotin.
2. Dezinfikujte membránu spojky miesta odberu vzoriek. Pomocou vhodnej sterilnej injekčnej striekačky a ihly odoberte celý objem z jednej liekovky (7,5 mL). Na odstránenie obsahu jednej liekovky postačí 10 mL injekčná striekačka. Injekčná striekačka by mala byť vybavená ihlou veľkosti 20 G.
3. Pomocou injekčného portu na spojke miesta odberu vzoriek vstreknite celý objem konjugátu do vaku Cell Preparation Bag (voliteľne preneste obsah vaku Cell Preparation Bag do nového transferového vaku, aby bola zabezpečená vysoká účinnosť ochudobňovania). Okamžite začnite inkubačnú dobu trvajúcu 30 minút.
4. Obidvoma rukami držte vak Cell Preparation Bag a jemným rotačným pohybom dôkladne premiešajte obsah. Zaznamenajte čas začatia inkubácie.
5. Umiestnite vak Cell Preparation Bag naplocho na orbitálny rotátor nastavený na rýchlosť približne 25 ot./min a uistite sa, že vak nie je zriasený alebo zahnutý. Inkubujte vak po celkovú dobu 30 minút pri kontrolovanej izbovej teplote (+19 °C až +25 °C [+66 až +77 °F]). Zaznamenajte čas zastavenia inkubácie.

Inkubácia s primárnou protilátkou (biotinylovaná protilátka od iného výrobcu)

1. Resuspendujte bunkovú peletu a označte bunky primárnou biotinylovanou protilátkou v čase a titri podľa odporúčania výrobcu protilátky. Uistite sa, že sú resuspendované všetky bunky. (Primárna protilátka by mala byť použitá v jej optimálnom titri, t. j. s optimálnou intenzitou farbenia a bez farbenia pozadia. Postupujte podľa návodu na použitie poskytnutého výrobcom primárnej protilátky.)
2. Inkubujte vak Cell Preparation Bag na orbitálnej trepačke pri 25 ot./min. Postupujte podľa návodu na použitie poskytnutého výrobcom primárnej protilátky.

Odstránenie prebytočného konjugátu (1. premytie) (len pre systémy CliniMACS Plus Anti-Biotin a systémy CliniMACS Plus TCRα/β-Biotin)

Zrieďte bunkový produkt tlmivým roztokom na celkovú hmotnosť 600 g. Vypočítajte Hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať (g), pomocou nasledujúcej rovnice a výsledok zaznamenajte.

Hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať (g)	=	600 g	–	Hmotnosť označeného bunkového produktu (g)

1. Podľa postupov opisovaných v krokoch „Riedenie bunkového východiskového produktu“ (kroky 1 – 8) zrieďte bunkový produkt tlmivým roztokom na celkovú hmotnosť 600 g.
2. Stanovte hmotnosť bunkového produktu po odstránení prebytočného konjugátu (1. premytie) odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplneného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť bunkového produktu po odstránení prebytočného konjugátu (1. premytie) (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag (g)

3. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte prázdny vak Wash Waste Bag k vaku Cell Preparation Bag.
4. Všetky voľné časti vaku Cell Preparation Bag alebo hadičiek sklopte smerom nadol. Oba vaky bezpečne umiestnite do nádoby na odstreďovanie.
5. Naplnenú nádobu vyvážte nádobou s vhodnou hmotnosťou. Je veľmi dôležité, aby bola odstredivka presne vyvážená.
6. Odstreďujte bunky za podmienok definovaných v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu.

7. Vaky vyberte z odstredivky, pričom dávajte pozor, aby ste neresuspendovali bunkovú peletu. Umiestnite vak Cell Preparation Bag na extraktor plazmy a pripojený odpadový vak na stolovú váhu.
8. Požadovaný počet premytí je uvedený v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu.
9. Upravte hmotnosť bunkovej suspenzie podľa opisu v časti „Úprava objemu“ na približne 190 g na účely magnetického označenia buniek pomocou činidla CliniMACS Anti-Biotin Reagent.

Inkubácia s imunoglobulínom na klinické použitie (len pre systémy CliniMACS Plus CD3 alebo CD3/CD19 System)

DÔLEŽITÉ

Majte na pamäti, že ľudský IgG nie je súčasťou systému CliniMACS. Používajte len ľudský IgG na klinické použitie schválený vo vašej krajine. Pozorne si prečítajte príbalový leták k použitému ľudskému IgG, predovšetkým časť týkajúcu sa reakcií z precitlivenosti a rizika infekcie, ktoré ľudský IgG ako krvný derivát predstavuje pre všetkých pacientov. Všetky riziká vyplývajúce z týchto materiálov musí posúdiť používateľ.

Dezinfikujte membránu spojky miesta odberu vzoriek vaku Cell Preparation Bag. Pomocou vhodnej sterilnej injekčnej striekačky a ihly pridajte 1,5 mg ľudského IgG na mL bunkového produktu (napr. 1,6 mL prípravku Gamunex 10 % na 95 mL bunkového produktu). Obsah dôkladne premiešajte. Inkubujte po dobu 5 minút pri kontrolovanej izbovej teplote s jemným otáčavým pohybom (napr. 25 ot./min na orbitálnom rotátore).

Magnetické označovanie buniek: inkubácia s činidlom CliniMACS

Liekovky s činidlom CliniMACS sú pripravené na použitie a postačujú na aplikáciu podľa opisu uvedeného nižšie. Činidlá nie sú určené na parenterálne podanie.

Činidlá skladujte pri teplote +2 až +8 °C (+36 až +46 °F). NEUCHOVÁVAJTE mrazničke. Činidlá sa musia používať studené priamo z chladničky. Pred použitím NEZAHRIEVAJTE. Číslo šarže a dátum najneskoršej spotreby činidiel sú vytlačené na štítku liekovky. NEPOUŽÍVAJTE činidlá po dátume najneskoršej spotreby.

1. Zaznamenajte číslo šarže a dátum najneskoršej spotreby činidla (činidiel) CliniMACS.
2. Dezinfikujte membránu spojky miesta odberu vzoriek. Pomocou vhodnej sterilnej injekčnej striekačky a ihly odoberte celý objem z a) jednej liekovky alebo b) dvoch liekoviek činidiel (každá 7,5 mL). Na odstránenie obsahu jednej liekovky činidla postačí 10 mL injekčná striekačka, resp. 20 mL injekčná striekačka na odstránenie obsahu dvoch liekoviek činidla. Injekčná striekačka by mala byť vybavená ihlou veľkosti 20 G.
3. Pomocou injekčného portu na spojke miesta odberu vzoriek vstreknite celý objem činidla do vaku Cell Preparation Bag (voliteľne pri aplikáciách ochudobňovania) preneste obsah vaku Cell Preparation Bag do nového transferového vaku, aby bola zabezpečená vysoká účinnosť ochudobňovania). V tejto chvíli začne bežať inkubačná doba.
4. Obidvoma rukami držte vak Cell Preparation Bag a jemným rotačným pohybom dôkladne premiešajte obsah.
5. Umiestnite vak Cell Preparation Bag naplocho na orbitálny rotátor nastavený na rýchlosť približne 25 ot./min a uistite sa, že vak nie je zriasený alebo zahnutý. Inkubujte vak po dobu a za podmienok definovaných v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu.

Odstránenie prebytočného činidla

Na odstránenie nenaviazaného činidla po dokončení inkubácie je potrebné bunky premyť. Informácie týkajúce sa požadovaného počtu premytí sú uvedené v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu.

1. Zasuňte hrot súpravy na prenos plazmy do portu vaku na tlmivý roztok, ktorý obsahuje najmenej 500 mL tlmivého roztoku. Skontrolujte, či je svorka na súprave na prenos plazmy v uzavretej polohe.
2. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak na tlmivý roztok k vaku Cell Preparation Bag. Vak na tlmivý roztok zaveste na vešiak na vaky.
3. Na váhu umiestnite vak Cell Preparation Bag a vyvážte váhu.
4. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do otvorenej polohy. Naplňte vak Cell Preparation Bag tlmivým roztokom na 600 mL. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do uzavretej polohy, aby sa zastavil prietok kvapaliny. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenajte hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag.
5. Zatavte hadičky medzi oboma svorkami, pričom na vaku Cell Preparation Bag ponechajte aspoň 15 cm hadičky na ďalšie pripojenie. Odpojte vak na tlmivý roztok.
6. Obidvoma rukami držte vak Cell Preparation Bag a jemným rotačným pohybom dôkladne premiešajte obsah.
7. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte prázdny vak Wash Waste Bag k vaku Cell Preparation Bag.
8. Všetky voľné časti vakov alebo hadičiek sklopte smerom nadol. Preneste vaky Cell Preparation Bag a Wash Waste Bag bezpečne do nádoby na odstreďovanie.
9. Odstreďujte bunky po dobu a za podmienok definovaných v časti špecifickej pre konkrétnu aplikáciu.
10. Vaky vyberte z odstredivky, pričom dávajte pozor, aby ste nenarušili bunkovú peletu.
11. Opatrne zaveste vak Cell Preparation Bag na extraktor plazmy.
12. Na váhu umiestnite vak Wash Waste Bag a vyvážte váhu.
13. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag. Pomocou extraktora plazmy odstráňte čo najviac supernatantu z vaku Cell Preparation Bag. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag, aby sa zastavil prietok kvapaliny.
14. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky, pričom ponechajte aspoň 15 cm hadičky na vaku Cell Preparation Bag na ďalšie pripojenie. Odpojte vak Wash Waste Bag.
15. Vak Wash Waste Bag si uchovajte, až kým sa nedokončí separácia a finálna analýza všetkých buniek.

16. Resuspendujte bunkovú peletu vo vaku Cell Preparation Bag. Vyhnite sa intenzívnemu miešaniu buniek. Uistite sa, že sú resuspendované všetky bunky.
17. Ak je potrebný väčší počet premytí (napr. na obohatenie CD34 pozitívnych buniek), zopakujte kroky 1 – 16.
18. Vyvážte váhu a odvážte naplnený vak Cell Preparation Bag. Zaznamenajte hmotnosť.
19. Stanovte hmotnosť bunkového produktu po premytí odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplneného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť bunkového produktu po premytí (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag (g)

20. Upravte objem nakladanej vzorky: Vypočítajte hmotnosť tlmivého roztoku potrebnú na úpravu hmotnosti bunkovej suspenzie na príslušný objem nakladanej vzorky podľa aplikácie pomocou nasledujúcej rovnice. Pri nakladaní označených a premytých buniek do súpravy hadičiek sa odporúča koncentrácia buniek maximálne $0,4 \times 10^9$ buniek na mL.

Hmotnosť tlmivého roztoku, ktorý sa má pridať (g)	=	Objem nakladanej vzorky (podľa aplikácie)	–	Hmotnosť bunkového produktu po premytí (g)

21. Pomocou sterilného hadičkového konektora pripojte vak na tlmivý roztok k vaku Cell Preparation Bag. Vak na tlmivý roztok zaveste na vešiak na vaky.
22. Na váhu umiestnite vak Cell Preparation Bag a vyvážte váhu.
23. Otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag. Posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do otvorenej polohy. Vizuálne sledujte stupnicu na váhe a vypočítanú hmotnosť tlmivého roztoku preneste do vaku Cell Preparation Bag.
24. Po prenesení príslušnej hmotnosti tlmivého roztoku posuňte svorku na súprave na prenos plazmy do uzavretej polohy, aby sa zastavil prietok kvapaliny. Zatvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Preparation Bag.
25. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky medzi oboma svorkami. Odpojte vak na tlmivý roztok.
26. Resuspendujte bunkovú peletu vo vaku Cell Preparation Bag. Vyhnite sa intenzívnemu miešaniu buniek. Uistite sa, že sú resuspendované všetky bunky.
27. Dezinfikujte membránu spojky miesta odberu vzoriek. Zasuňte ihlu s vhodnou injekčnou striekačkou do spojky miesta odberu vzoriek na vaku Cell Preparation Bag a odoberte objem 0,5 mL označeného produktu. Preneste vzorku do skúmavky na vzorky. Označte skúmavku ako PÔVODNÁ (mala by obsahovať identifikačné údaje pacienta) a uchovajte na analýzu.
28. Vyvážte váhu a odvážte naplnený vak Cell Preparation Bag. Zaznamenajte hmotnosť.

29. Stanovte hmotnosť bunkového produktu po pridaní tlmivého roztoku (objem nakladanej vzorky) odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Preparation Bag od hmotnosti naplneného vaku Cell Preparation Bag. Zaznamenajte vypočítanú hmotnosť.

Hmotnosť bunkového produktu po pridaní tlmivého roztoku (g)	=	Hmotnosť naplneného vaku Cell Preparation Bag (g)	–	Hmotnosť prázdneho vaku Cell Preparation Bag (g)

▶ **Prejdite na KROK 2.**

NEPRIPOJUJTE vak Cell Preparation Bag k súprave hadičiek, dokiaľ sa na displeji prístroja nezobrazí pokyn na pripojenie.

7.2 KROK 2: Výber separačného programu

7.2.1 Zapnutie prístroja CliniMACS Plus Instrument

Pomocou vypínača ON/OFF, ktorý je umiestnený na zadnom paneli prístroja, zapnite prístroj CliniMACS Plus Instrument. Zaznamenajte dobu spustenia chodu prístroja.

V okne sa zobrazí hlavná obrazovka uvedená v časti „Inštalácia“ používateľskej príručky prístroja CliniMACS Plus Instrument.

Na pokračovanie do ponuky programu stlačte tlačidlo **ENT**.

7.2.2 CD34 SELECTION 1/2

DÔLEŽITÉ

- CD34 SELECTION 1 sa musí používať výhradne v kombinácii so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set REF 161-01), zatiaľ čo CD34 SELECTION 2 sa musí používať výhradne v kombinácii so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Pred inštaláciou dôkladne prekontrolujte súpravu hadičiek.
- V okne zobrazenia sa na obrazovke zobrazujú výzvy a diagramy, ktoré slúžia ako pokyny na vykonávanie postupov. Pred prechodom k nasledujúcemu kroku vykonajte a prekontrolujte každý krok podľa pokynov uvedených v návode na použitie. Na opravu prípadnej chyby počas zadávania údajov stlačte tlačidlo „Undo“ (Vrátiť späť) (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

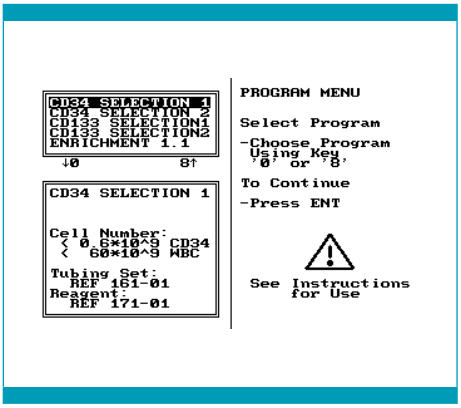
Voľba separačného programu CD34 SELECTION 1/2

Okno označuje Obrazovka 7.1.

Podľa konkrétnej aplikácie vyberte program CD34 SELECTION 1 alebo CD34 SELECTION 2.

Na výber separačného programu zvýraznite názov programu čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá **0** a **8**.

Na pokračovanie na zvýraznený program stlačte tlačidlo **ENT**.



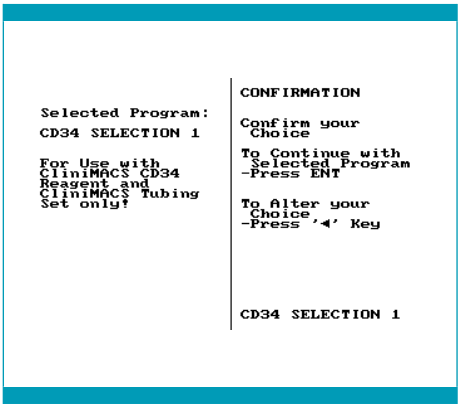
Obrazovka 7.1: Výber separačného programu

Potvrdenie

Okno označuje Obrazovka 7.2.

Na potvrdenie separačného programu a pokračovanie stlačte tlačidlo **ENT**.

V opačnom prípade stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.



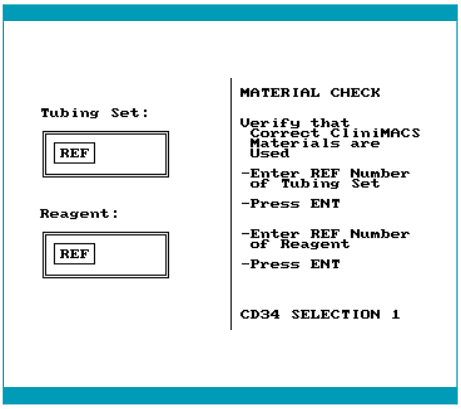
Obrazovka 7.2: Potvrdenie

Kontrola materiálov

Okno označuje Obrazovka 7.3.

Programy CD34 SELECTION 1 a CD34 SELECTION 2 sú optimalizované na obohacovanie CD34 pozitívnych buniek.

Na potvrdenie, že je k dispozícii vhodná súprava hadičiek a že na označenie buniek bolo použité správne činidlo, zadajte do poľa pre dotaz príslušné katalógové číslo (REF). Softvér prístroja skontroluje, či je možné použiť dané materiály v kombinácii so zvoleným programom.



Obrazovka 7.3: Kontrola materiálov

1. Zadajte katalógové číslo súpravy hadičiek, ktorá sa bude používať na automatickú separáciu buniek. Na potvrdenie a pokračovanie stlačte tlačidlo **ENT**.
2. Zadajte katalógové číslo činidla, ktoré sa použilo na označenie buniek. Na potvrdenie a pokračovanie stlačte tlačidlo **ENT**.

Pri zadaní katalógového čísla súpravy hadičiek alebo činidla, ktoré nie je špecifikované pre zvolený separačný program, sa zobrazí hlásenie. Na potvrdenie stlačte tlačidlo ENT a znova zadajte správne katalógové číslo. Ak je zadané číslo stále nesprávne, hlásenie sa zobrazí po druhý raz. Po stlačení tlačidla ENT sa program automaticky vráti do programovej ponuky (pozrite si Obrazovka 7.1).

DÔLEŽITÉ

- CD34 SELECTION 1 sa musí používať výhradne v kombinácii so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set REF 161-01), zatiaľ čo CD34 SELECTION 2 sa musí používať výhradne v kombinácii so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01). Pred inštaláciou dôkladne prekontrolujte súpravu hadičiek.
- Na opravu prípadnej chyby počas zadávania údajov stlačte tlačidlo „Undo“ (Vrátiť späť)(pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

Ak kontrola materiálov prebehla úspešne, program bude automaticky pokračovať pokynmi na inštaláciu súpravy hadičiek.

▶ **Prejdite na KROK 3.**

7.2.3 ENRICHMENT 1.1

DÔLEŽITÉ

- Separačný program ENRICHMENT 1.1 sa musí používať výhradne so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- V okne zobrazenia sa na obrazovke zobrazujú výzvy a diagramy, ktoré slúžia ako pokyny na vykonávanie postupov. Pred prechodom k nasledujúcemu kroku vykonajte a prekontrolujte každý krok podľa pokynov uvedených v návode na použitie. Na opravu prípadnej chyby počas zadávania údajov stlačte tlačidlo „Undo“ (Vrátiť späť) (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

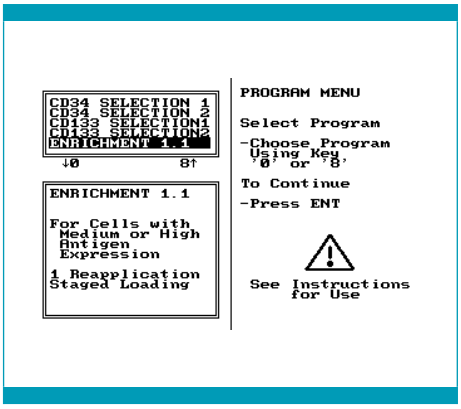
Výber separačného programu ENRICHMENT 1.1

Okno označuje Obrazovka 7.4.

Vyberte program ENRICHMENT 1.1.

Na výber separačného programu zvýraznite názov programu čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá 0 a 8.

Na pokračovanie na zvýraznený program stlačte tlačidlo ENT.



Obrazovka 7.4: Výber separačného programu

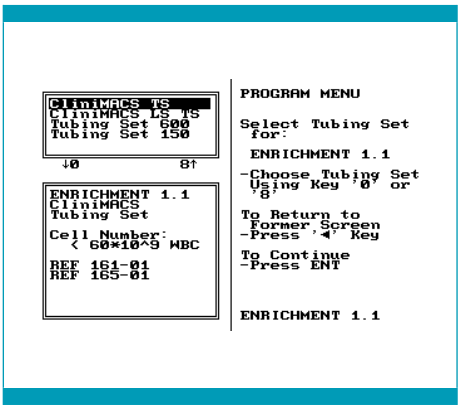
Výber súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.5.

Skontrolujte, či ste vybrali správny program. V opačnom prípade stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.

Vyberte súpravu hadičiek zvýraznením v poli vľavo hore s čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá 0 a 8.

V okne nižšie sa zobrazia príslušné údaje, ako napríklad kapacita a katalógové číslo vybratej súpravy hadičiek.



Obrazovka 7.5: Výber súpravy hadičiek

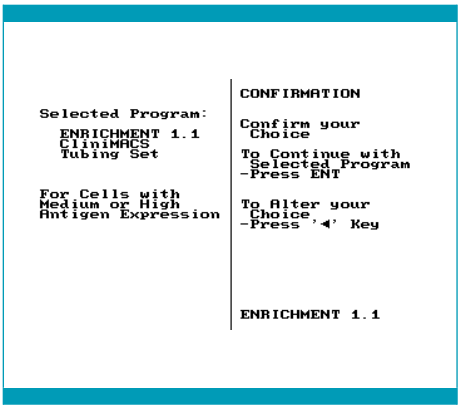
Na pokračovanie s vybratou kombináciou separačného programu a súpravy hadičiek stlačte tlačidlo ENT.

Potvrdenie

Okno označuje Obrazovka 7.6.

Na potvrdenie vybratej kombinácie separačného programu a súpravy hadičiek a Pokračujte stlačením tlačidla ENT.

V opačnom prípade stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.



Obrazovka 7.6: Potvrdenie

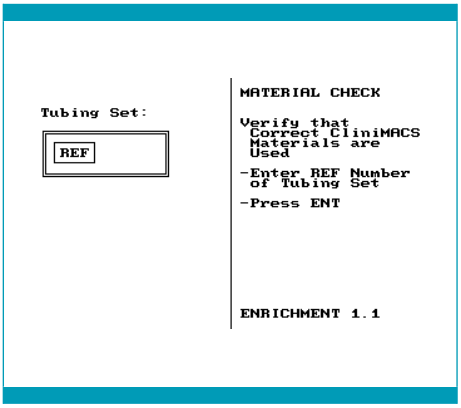
Kontrola materiálov

Okno označuje Obrazovka 7.7.

Dotaz na katalógové číslo (REF) súpravy hadičiek má slúžiť ako bezpečnostná kontrola, aby sa zaistilo, že vybratú súpravu hadičiek možno použiť s vybratým programom.

Zadajte katalógové číslo vybratej súpravy hadičiek a Pokračujte stlačením tlačidla ENT.

Ak bolo zadané nezodpovedajúce katalógové číslo, zobrazí sa hlásenie. Na potvrdenie stlačte tlačidlo ENT a zadajte správne katalógové číslo.



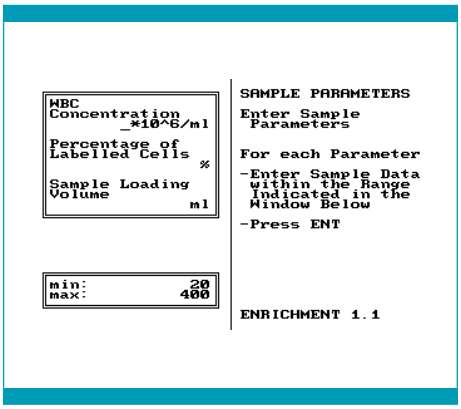
Obrazovka 7.7: Kontrola materiálov

Ak je zadané číslo stále nesprávne, hlásenie sa zobrazí po druhý raz. Po stlačení tlačidla ENT sa program automaticky vráti do programovej ponuky (pozrite si Obrazovka 7.4).

Zadanie parametrov vzorky

Ak prebehla kontrola materiálov úspešne, program bude automaticky pokračovať dotazom na parametre vzorky, ktoré sú potrebné na nastavenie separácie pre jednotlivé vzorky a na poskytnutie dôležitých informácií operátorovi týkajúcich sa požadovaných objemov tlmivých roztokov a vakov.

Okno označuje Obrazovka 7.8.



Obrazovka 7.8: Zadanie parametrov vzorky

1. Začnite zadaním koncentrácie WBC vo vzorke. Povolený rozsah je zobrazený v poli vľavo dole. Na opravu nesprávneho zadania stlačte tlačidlo ◄.

   Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne. Na pokračovanie v ďalšom zadávaní stlačte tlačidlo ENT.

   DÔLEŽITÉ

   Všetky požadované parametre vzorky sa týkajú vzorky po vykonaní postupu označenia a premytia buniek. Povolený rozsah zobrazený v poli vľavo dole zohľadňuje vždy predchádzajúce zadanie. Softvér po každom zadaní vypočíta a upraví akceptovaný rozsah nasledujúceho dotazu.

   ⚠ UPOZORNENIE

   Zadanie nesprávnych parametrov môže viesť k neoptimálnemu spracovaniu vzorky a zvýšiť tak riziko straty cieľových buniek. Zadanie hodnôt koncentrácie WBC a/alebo percenta označených buniek, ktoré sú nižšie než skutočné hodnoty vzorky, môže spôsobiť stratu buniek v dôsledku preťaženia systému. Zadanie nižšieho objemu vzorky môže spôsobiť stratu buniek v dôsledku preťaženia či dokonca neúplné spracovanie vzorky. Ak je špecifikácia niektorého z troch parametrov príliš vysoká, povedie to k predĺženiu doby spracovania a zväčšeniu objemu frakcie cieľových buniek. Vždy sa uistite, že zadávate správne parametre.

2. Zadajte percento označených buniek. Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne (pozrite si časť „Dôležité“). Na pokračovanie v ďalšom zadávaní stlačte tlačidlo ENT.

3. Zadajte finálny objem vzorky buniek. Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne (pozrite si časť „Dôležité“).

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Výpočet

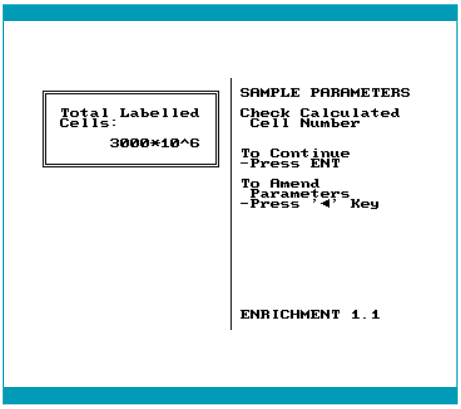
Softvér CliniMACS Plus vypočíta celkový počet označených buniek, aby sa overilo, či je separačná kapacita dostatočná.

Výsledok sa zobrazí na jednej z dvoch dostupných obrazoviek:

- Výsledok výpočtu sa zobrazí na obrazovke podobnej Obrazovka 7.9. Uistite sa, či je vypočítaný počet označených buniek správny.

  Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

  Je možné vykonať opravu údajov. Na návrat na predchádzajúcu obrazovku na účely opravy stlačte tlačidlo ◄.

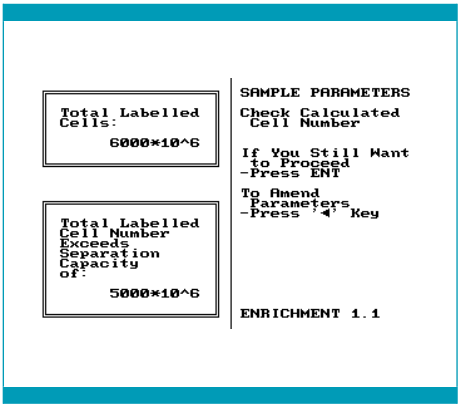


Obrazovka 7.9: Výpočet

- Ak vypočítaný počet označených buniek prekročí separačnú kapacitu systému CliniMACS Plus, zobrazí sa obrazovka podobná Obrazovka 7.10. Uistite sa, či boli zadané správne parametre vzorky a či bol vypočítaný správny počet buniek. Stlačením tlačidla ◄ sa vráťte na predchádzajúcu Obrazovka 7.8 a opravte parametre vzorky.

  Aby nedošlo k preťaženiu systému, vzorku rozdeľte a stanovte objem jednotlivých častí. Stlačením tlačidla ◄ sa vráťte na predchádzajúcu Obrazovka 7.8. Zadajte parametre vzorky pre prvú alikvotnú časť vzorky a pokračujte separáciou tejto časti. Po dokončení separácie začnite druhú separáciu s druhou alikvotnou časťou pomocou novej súpravy hadičiek.

  Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrazovka 7.10: Výpočet: Počet buniek prekračuje separačnú kapacitu

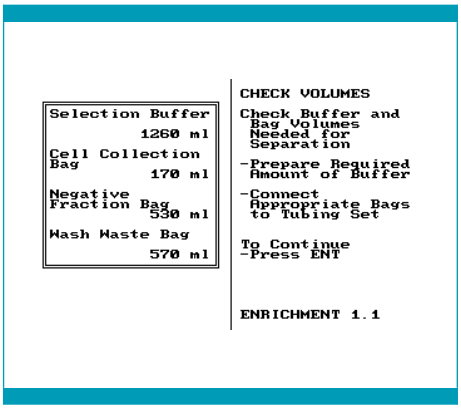
Informácie o objeme

Z celkového počtu označených buniek (pozrite si časť „Výpočet“) softvér vypočíta počet separačných stupňov, množstvo tlmivého roztoku potrebného na celú separáciu a objemy kvapaliny, ktoré budú zhromaždené vo vakoch Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a Cell Collection Bag.

Štandardné hodnoty sú nasledovné:

- CliniMACS PBS/EDTA Buffer: 1 000 mL
- Negative Fraction Bag: 500 mL
- Buffer Waste Bag: 500 mL
- Cell Collection Bag: 150 mL

Ak jedna z vypočítaných hodnôt prekročí uvedené štandardné hodnoty, objaví sa Obrazovka 7.11 informujúca o množstve kvapaliny, ktoré bude potrebné a ktoré sa nahromadí počas separačného procesu. Ak je potrebná výmena, vymeňte vaky dodané so súpravou hadičiek (kapacita približne 500 mL) za alternatívne vaky vhodnej veľkosti. Vaky pôvodne pripojené k súprave hadičiek sú pripojené pomocou spojok luer. Vaky, ktorými sa nahradia pôvodné vaky, musia mať zásuvkový konektor typu luer (female luer). Štandardné vaky možno pripojiť pomocou spojky Luer/Spike Interconnector.



Obrazovka 7.11: Kontrola objemov

1. Skontrolujte, či je k dispozícii požadované množstvo tlmivého roztoku. Na jeden vešiak na vaky nedávajte viac než tri litre tlmivého roztoku.

   POZNÁMKA

   Existuje riziko poškodenia prístroja. Preťaženie vešiakov na vaky môže prístroj poškodiť. Nosnosť jedného vešiaka na vaky je 3 kg. Vešiaky na vaky nepreťažujte.

2. Za sterilných podmienok otvorte zásobník súpravy hadičiek a v prípade potreby nahraďte pôvodné vaky väčšími. Zaistite neobmedzený prietok do týchto vakov.

3. K voľnému konektoru typu luer pripojte dostatočne veľký vak Cell Collection Bag. Ak to Obrazovka 7.11 neuvádza, maximálny elučný objem frakcie cieľových buniek je 150 mL. Uistite sa, že je možný neobmedzený prietok do vaku Cell Collection Bag.

DÔLEŽITÉ

- Uistite sa, že je k dispozícii požadované množstvo tlmivého roztoku a objem vakov, ktorý uvádza Obrazovka 7.11, je dostatočný. V opačnom prípade bude ohrozená účinnosť separácie.
- Akúkoľvek úpravu súprav hadičiek CliniMACS je potrebné vykonať za sterilných podmienok, napr. v digestore s laminárnym prúdením.
- Pri ďalšej analýze alebo spracovaní buniek majte na pamäti, že objemy, ktoré uvádza Obrazovka 7.11, nie sú presné, sú to objemy vyhovujúce bezpečnostným požiadavkám.

4. Skontrolujte spojky luer lock na stĺpcoch. Spojky luer lock musia byť pevne uzavreté.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Program automaticky pokračuje podľa pokynov na inštaláciu súpravy hadičiek na prístroj.

▶ **Prejdite na KROK 3.**

7.2.4 ENRICHMENT 3.2

DÔLEŽITÉ

- Separačný program ENRICHMENT 3.2 sa musí používať výhradne so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01).
- V okne zobrazenia sa na obrazovke zobrazujú výzvy a diagramy, ktoré slúžia ako pokyny na vykonávanie postupov. Pred prechodom k nasledujúcemu kroku vykonajte a prekontrolujte každý krok podľa pokynov uvedených v návode na použitie. Na opravu prípadnej chyby počas zadávania údajov stlačte tlačidlo „Undo“ (Vrátiť späť) (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

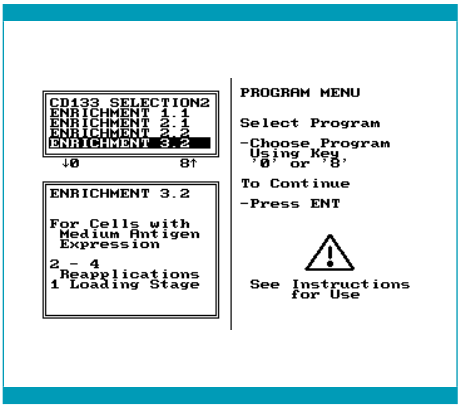
Výber separačného programu ENRICHMENT 3.2

Okno označuje Obrazovka 7.12.

Vyberte program ENRICHMENT 3.2.

Na výber separačného programu zvýraznite názov programu čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá **0** a **8**.

Na pokračovanie na zvýraznený program stlačte tlačidlo **ENT**.



Obrazovka 7.12: Výber separačného programu

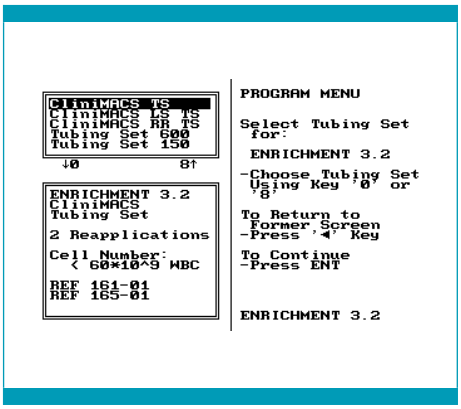
Výber súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.13.

Skontrolujte, či ste vybrali správny program. Ak nie, stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.

Vyberte súpravu hadičiek zvýraznením v poli vľavo s čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá **0** a **8**.

V okne nižšie sa zobrazia príslušné údaje, ako napríklad kapacita a katalógové číslo vybratej súpravy hadičiek.



Obrazovka 7.13: Výber súpravy hadičiek

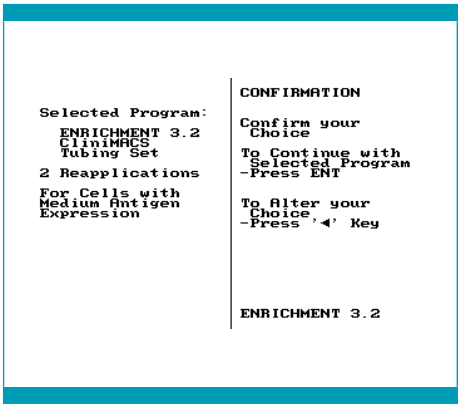
Na pokračovanie s vybratou kombináciou separačného programu a súpravy hadičiek stlačte tlačidlo **ENT**.

Potvrdenie

Okno označuje Obrazovka 7.14.

Na potvrdenie vybratej kombinácie separačného programu a súpravy hadičiek a Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

V opačnom prípade stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.



Obrazovka 7.14: Potvrdenie

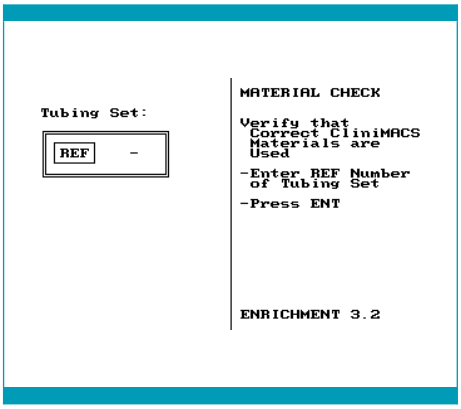
Kontrola materiálov

Okno označuje Obrazovka 7.15.

Dotaz na katalógové číslo (REF) súpravy hadičiek má slúžiť ako bezpečnostná kontrola, aby sa zaistilo, že vybratú súpravu hadičiek možno použiť s vybratým programom.

Zadajte katalógové číslo vybratej súpravy hadičiek a Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Ak bolo zadané nezodpovedajúce katalógové číslo, zobrazí sa hlásenie.



Obrazovka 7.15: Kontrola materiálov

Na potvrdenie stlačte tlačidlo ENT a zadajte správne katalógové číslo. Ak je zadané číslo stále nesprávne, hlásenie sa zobrazí po druhý raz. Po stlačení tlačidla ENT sa program automaticky vráti do programovej ponuky (pozrite si Obrazovka 7.12).

Ak kontrola materiálov prebehla úspešne, program bude automaticky pokračovať pokynmi na inštaláciu súpravy hadičiek.

▶ **Prejdite na KROK 3.**

7.2.5 DEPLETION 2.1

DÔLEŽITÉ

- Separačný program DEPLETION 2.1 sa musí používať výhradne so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).
- V okne zobrazenia sa na obrazovke zobrazujú výzvy a diagramy, ktoré slúžia ako pokyny na vykonávanie postupov. Pred prechodom k nasledujúcemu kroku vykonajte a prekontrolujte každý krok podľa pokynov uvedených v návode na použitie. Na opravu prípadnej chyby počas zadávania údajov stlačte tlačidlo „Undo“ (Vrátiť späť) (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

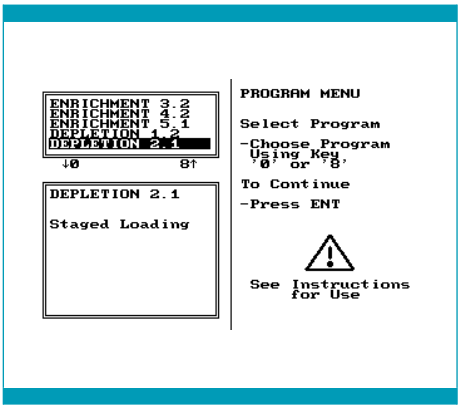
Výber separačného programu DEPLETION 2.1

Okno označuje Obrazovka 7.16.

Vyberte program DEPLETION 2.1

Na výber separačného programu zvýraznite názov programu čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá 0 a 8.

Na pokračovanie na zvýraznený program stlačte tlačidlo ENT.



Obrazovka 7.16: Výber separačného programu

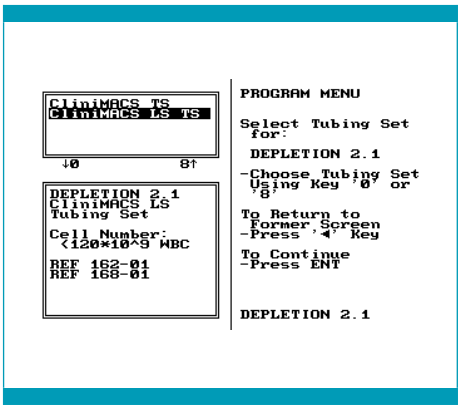
Výber súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.17.

Skontrolujte, či ste vybrali správny program.

V opačnom prípade stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.

Vyberte súpravu hadičiek zvýraznením v poli vľavo hore s čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá 0 a 8.



Obrazovka 7.17: Výber súpravy hadičiek

V okne nižšie sa zobrazia príslušné údaje, ako napríklad kapacita a katalógové číslo vybratej súpravy hadičiek.

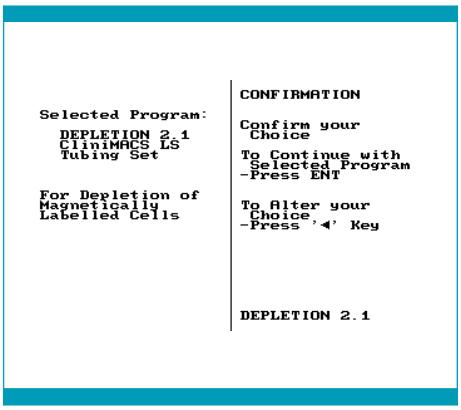
Na pokračovanie s vybratou kombináciou separačného programu a súpravy hadičiek stlačte tlačidlo ENT.

Potvrdenie

Okno označuje Obrazovka 7.18.

Na potvrdenie vybratej kombinácie separačného programu a súpravy hadičiek a Pokračujte stlačením tlačidla ENT.

V opačnom prípade stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.



Obrazovka 7.18: Potvrdenie

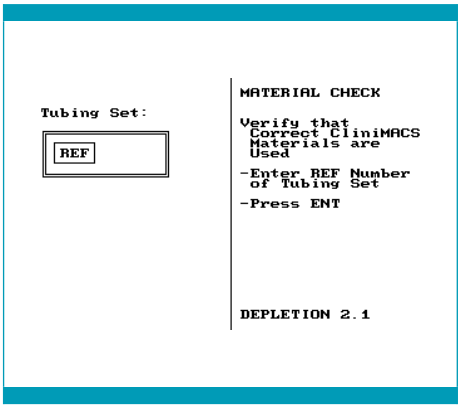
Kontrola materiálov

Okno označuje Obrazovka 7.19.

Dotaz na katalógové číslo (REF) súpravy hadičiek má slúžiť ako bezpečnostná kontrola, aby sa zaistilo, že súpravu hadičiek vybratú používateľom možno použiť.

Zadajte katalógové číslo vybratej súpravy hadičiek a Pokračujte stlačením tlačidla ENT.

Ak bolo zadané nezodpovedajúce katalógové číslo, zobrazí sa hlásenie.



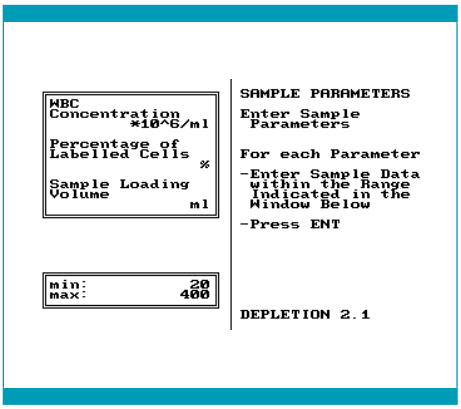
Obrazovka 7.19: Kontrola materiálov

Na potvrdenie stlačte tlačidlo ENT a zadajte správne katalógové číslo. Ak je zadané číslo stále nesprávne, hlásenie sa zobrazí po druhý raz. Po stlačení tlačidla ENT sa program automaticky vráti do programovej ponuky (pozrite si Obrazovka 7.16).

Zadanie parametrov vzorky

Ak prebehla kontrola materiálov úspešne, program bude automaticky pokračovať dotazom na parametre vzorky, ktoré sú potrebné na nastavenie separácie pre jednotlivé vzorky a na poskytnutie dôležitých informácií operátorovi týkajúcich sa požadovaných objemov tlmivých roztokov a vakov.

Okno označuje Obrazovka 7.20.



Obrazovka 7.20: Zadanie parametrov vzorky

1. Začnite zadaním koncentrácie WBC vo vzorke. Povolený rozsah je zobrazený v poli vľavo dole. Na opravu nesprávneho zadania stlačte tlačidlo ◄.

   Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne.

   DÔLEŽITÉ

   Všetky požadované parametre vzorky sa týkajú vzorky po vykonaní postupu označenia a premytia buniek. Povolený rozsah zobrazený v poli vľavo dole zohľadňuje vždy predchádzajúce zadanie. Softvér po každom zadaní vypočíta a upraví akceptovaný rozsah nasledujúceho dotazu.

   ⚠ UPOZORNENIE

   Zadanie nesprávnych parametrov môže viesť k neoptimálnemu spracovaniu vzorky a zvýšiť tak riziko straty cieľových buniek. Zadanie hodnôt koncentrácie WBC a/alebo percenta označených buniek, ktoré sú nižšie než skutočné hodnoty vzorky, môže spôsobiť stratu buniek v dôsledku preťaženia systému. Zadanie nižšieho objemu vzorky môže spôsobiť stratu buniek v dôsledku preťaženia či dokonca neúplné spracovanie vzorky. Ak je špecifikácia niektorého z troch parametrov príliš vysoká, povedie to k predĺženiu doby spracovania a zväčšeniu objemu frakcie cieľových buniek. Vždy sa uistite, že zadávate správne parametre.

   Na pokračovanie v ďalšom zadávaní stlačte tlačidlo ENT.

2. Zadajte percento označených buniek. Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne (pozrite si časť „Dôležité“).

   Na pokračovanie v ďalšom zadávaní stlačte tlačidlo ENT.

3. Zadajte finálny objem vzorky buniek. Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne (pozrite si časť „Dôležité“).

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Výpočet

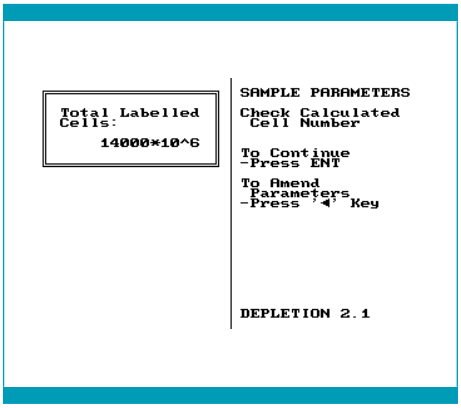
Softvér CliniMACS Plus vypočíta celkový počet označených buniek, aby sa overilo, či je separačná kapacita dostatočná.

Výsledok sa zobrazí na jednej z dvoch dostupných obrazoviek:

- Výsledok výpočtu sa zobrazí na obrazovke podobnej Obrazovka 7.21. Uistite sa, či je vypočítaný počet označených buniek správny.

  Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

  Je možné vykonať opravu údajov. Na návrat na predchádzajúcu obrazovku na účely opravy stlačte tlačidlo ◄.

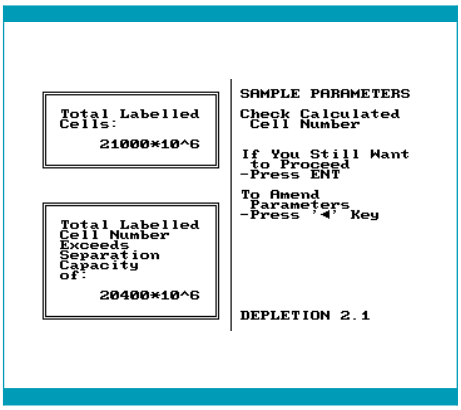


Obrazovka 7.21: Výpočet

- Ak vypočítaný počet označených buniek prekročí separačnú kapacitu systému CliniMACS Plus, zobrazí sa obrazovka podobná Obrazovka 7.22. Uistite sa, či boli zadané správne parametre vzorky a či bol vypočítaný správny počet buniek. Stlačením tlačidla ◄ sa vráťte na predchádzajúcu obrazovku a opravte parametre vzorky.

  Aby nedošlo k preťaženiu systému, vzorku rozdeľte a stanovte objem jednotlivých častí. Stlačením tlačidla ◄ sa vráťte na predchádzajúcu Obrazovka 7.20. Zadajte parametre vzorky pre prvú alikvotnú časť vzorky a pokračujte separáciou tejto časti. Po dokončení separácie začnite druhú separáciu s druhou alikvotnou časťou pomocou novej súpravy hadičiek.

  Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrazovka 7.22: Výpočet: Počet buniek prekračuje separačnú kapacitu

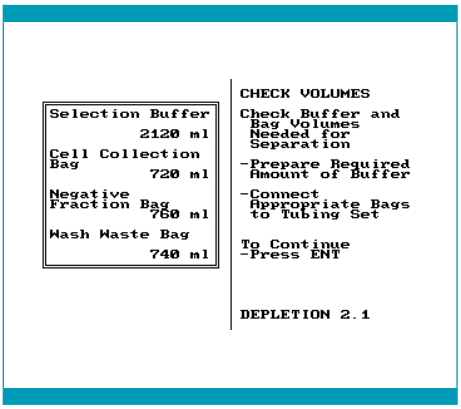
Informácie o objeme

Z celkového počtu označených buniek (pozrite si časť „Výpočet“) softvér vypočíta počet separačných stupňov, množstvo tlmivého roztoku potrebného na celú separáciu a objemy kvapaliny, ktoré budú zhromaždené vo vakoch Negative Fraction Bag, Buffer Waste Bag a Cell Collection Bag.

Štandardné hodnoty sú nasledovné:

- 1 000 mL tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer
- 500 mL vak Negative Fraction Bag
- 500 mL vak Buffer Waste Bag
- 150 mL vak Cell Collection Bag

Ak jedna z vypočítaných hodnôt prekročí uvedené štandardné hodnoty, objaví sa Obrazovka 7.23 informujúca o množstve kvapaliny, ktoré bude potrebné a ktoré sa nahromadí počas separačného procesu. Ak je potrebná výmena, vymeňte vaky dodané so súpravou hadičiek (kapacita približne 500 mL) za alternatívne vaky vhodnej veľkosti. Vaky pôvodne pripojené k súprave hadičiek sú pripojené pomocou spojok luer. Vaky, ktorými sa nahradia pôvodné vaky, musia mať zásuvkový konektor typu luer (female luer). Štandardné vaky možno pripojiť pomocou spojky Luer/Spike Interconnector.



Obrazovka 7.23: Kontrola objemov

1. Skontrolujte, či je k dispozícii požadované množstvo tlmivého roztoku. Na jeden vešiak na vaky nedávajte viac než tri litre tlmivého roztoku.

   POZNÁMKA

   Existuje riziko poškodenia prístroja. Preťaženie vešiakov na vaky môže prístroj poškodiť. Nosnosť jedného vešiaka na vaky je 3 kg. Vešiaky na vaky nepreťažujte.

2. Za sterilných podmienok otvorte zásobník súpravy hadičiek a v prípade potreby nahraďte pôvodné vaky väčšími. Zaistite neobmedzený prietok do týchto vakov.

3. K voľnému konektoru typu luer pripojte dostatočne veľký vak Cell Collection Bag. Ak to Obrazovka 7.23 neuvádza, maximálny elučný objem frakcie cieľových buniek je 150 mL. Uistite sa, že je možný neobmedzený prietok do vaku Cell Collection Bag.

   DÔLEŽITÉ

   - Uistite sa, že je k dispozícii požadované množstvo tlmivého roztoku a objem vakov, ktorý uvádza Obrazovka 7.23, je dostatočný. V opačnom prípade bude ohrozená účinnosť separácie.
   - Akúkoľvek úpravu súprav hadičiek CliniMACS je potrebné vykonať za sterilných podmienok, napr. v digestore s laminárnym prúdením.
   - Pri ďalšej analýze alebo spracovaní buniek majte na pamäti, že objemy, ktoré uvádza Obrazovka 7.23, nie sú presné, sú to objemy vyhovujúce bezpečnostným požiadavkám.

4. Skontrolujte spojky luer lock na stĺpcoch. Spojky luer lock musia byť pevne uzavreté.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Program automaticky pokračuje podľa pokynov na inštaláciu súpravy hadičiek na prístroj.

▶ **Prejdite na KROK 3.**

7.2.6 DEPLETION 3.1

DÔLEŽITÉ

- Separačný program DEPLETION 3.1 sa musí používať výhradne so súpravou hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set (REF 261-01).
- V okne zobrazenia sa na obrazovke zobrazujú výzvy a diagramy, ktoré slúžia ako pokyny na vykonávanie postupov. Pred prechodom k nasledujúcemu kroku vykonajte a prekontrolujte každý krok podľa pokynov uvedených v návode na použitie. Na opravu prípadnej chyby počas zadávania údajov stlačte tlačidlo „Undo“ (Vrátiť späť) (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

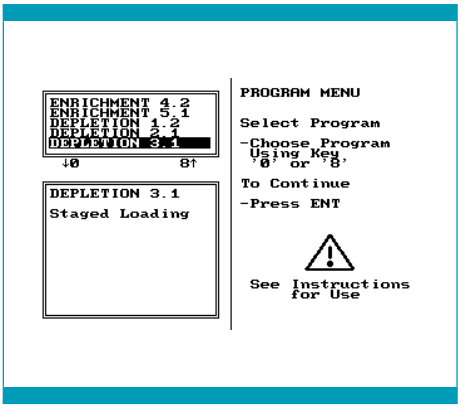
Výber separačného programu DEPLETION 3.1

Okno označuje Obrazovka 7.24.

Vyberte program DEPLETION 3.1

Na výber separačného programu zvýraznite názov programu čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá 0 a 8.

Na pokračovanie na zvýraznený program stlačte tlačidlo ENT.



Obrazovka 7.24: Výber separačného programu

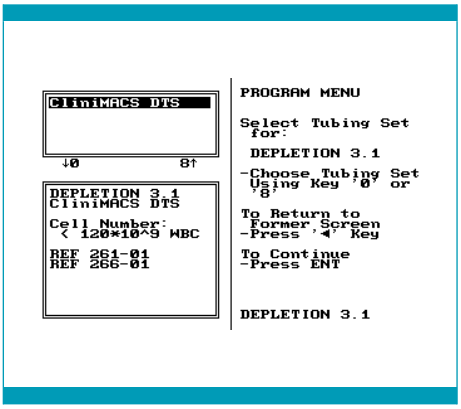
Výber súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.25.

Skontrolujte, či ste vybrali správny program. V opačnom prípade stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.

Vyberte súpravu hadičiek zvýraznením v poli vľavo hore s čiernym pruhom. Na posúvanie lišty nahor a nadol použite tlačidlá 0 a 8.

V okne nižšie sa zobrazia príslušné údaje, ako napríklad kapacita a katalógové číslo vybratej súpravy hadičiek.
Na pokračovanie s vybratou kombináciou separačného programu a súpravy hadičiek stlačte tlačidlo ENT.



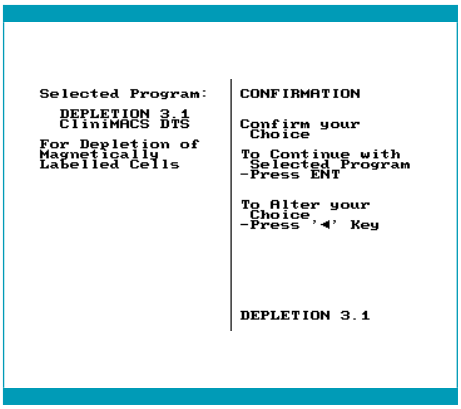
Obrazovka 7.25: Výber súpravy hadičiek

Potvrdenie

Okno označuje Obrazovka 7.26.

Na potvrdenie vybratej kombinácie separačného programu a súpravy hadičiek a Pokračujte stlačením tlačidla ENT.

V opačnom prípade stlačte ◄ na návrat k predchádzajúcemu kroku, aby ste mohli výber upraviť.



Obrazovka 7.26: Potvrdenie

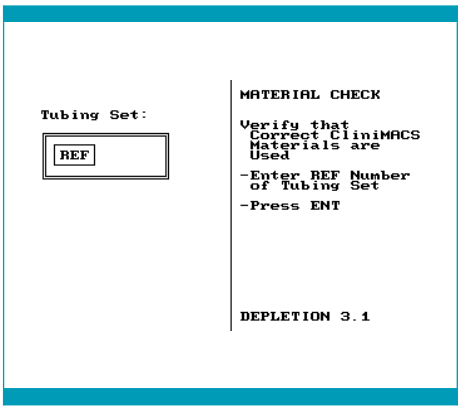
Kontrola materiálov

Okno označuje Obrazovka 7.27.

Dotaz na katalógové číslo (REF) súpravy hadičiek má slúžiť ako bezpečnostná kontrola, aby sa zaistilo, že súpravu hadičiek vybratú používateľom možno použiť.

Zadajte katalógové číslo vybratej súpravy hadičiek a Pokračujte stlačením tlačidla ENT.

Ak bolo zadané nezodpovedajúce katalógové číslo, zobrazí sa hlásenie.



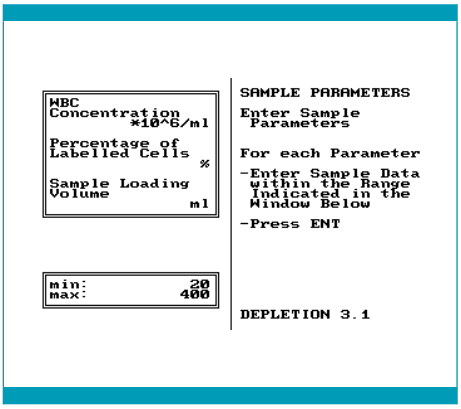
Obrazovka 7.27: Kontrola materiálov

Na potvrdenie stlačte tlačidlo ENT a zadajte správne katalógové číslo. Ak je zadané číslo stále nesprávne, hlásenie sa zobrazí po druhý raz. Po stlačení tlačidla ENT sa program automaticky vráti do programovej ponuky (pozrite si Obrazovka 7.25).

Zadanie parametrov vzorky

Ak prebehla kontrola materiálov úspešne, program bude automaticky pokračovať dotazom na niektoré parametre vzorky, ktoré sú potrebné na nastavenie separácie pre jednotlivé vzorky a na poskytnutie dôležitých informácií operátorovi týkajúcich sa požadovaných objemov tlmivých roztokov a vakov.

Okno označuje Obrazovka 7.28.



Obrazovka 7.28: Zadanie parametrov vzorky

1. Začnite zadaním koncentrácie WBC vo vzorke. Povolený rozsah je zobrazený v poli vľavo dole. Na opravu nesprávneho zadania stlačte tlačidlo ◄.

   Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne.

   DÔLEŽITÉ
   Všetky požadované parametre vzorky sa týkajú vzorky po vykonaní postupu označenia a premytia buniek. Povolený rozsah zobrazený v poli vľavo dole zohľadňuje vždy predchádzajúce zadanie. Softvér po každom zadaní vypočíta a upraví akceptovaný rozsah nasledujúceho dotazu.

   ⚠ UPOZORNENIE

   Zadanie nesprávnych parametrov môže viesť k neoptimálnemu spracovaniu vzorky a zvýšiť tak riziko straty cieľových buniek. Zadanie hodnôt koncentrácie WBC a/alebo percenta označených buniek, ktoré sú nižšie než skutočné hodnoty vzorky, môže spôsobiť stratu buniek v dôsledku preťaženia systému. Zadanie nižšieho objemu vzorky môže spôsobiť stratu buniek v dôsledku preťaženia či dokonca neúplné spracovanie vzorky. Ak je špecifikácia niektorého z troch parametrov príliš vysoká, povedie to k predĺženiu doby spracovania a zväčšeniu objemu frakcie cieľových buniek. Vždy sa uistite, že zadávate správne parametre.

   Na pokračovanie v ďalšom zadávaní stlačte tlačidlo ENT.

2. Zadajte percento označených buniek. Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne (pozrite si časť „Dôležité“).

   Na pokračovanie v ďalšom zadávaní stlačte tlačidlo ENT.

3. Zadajte finálny objem vzorky buniek. Potvrďte, že zadaná hodnota zodpovedá hodnote vzorky. V opačnom prípade spracovanie vzorky nemusí byť optimálne (pozrite si časť „Dôležité“).

Pokračujte stlačením tlačidla ENT.

Výpočet

Softvér CliniMACS Plus vypočíta celkový počet označených buniek, aby sa overilo, či je separačná kapacita dostatočná.

Výsledok sa zobrazí na jednej z dvoch dostupných obrazoviek:

- Výsledok výpočtu sa zobrazí na obrazovke podobnej Obrazovka 7.29. Uistite sa, či je vypočítaný počet označených buniek správny.

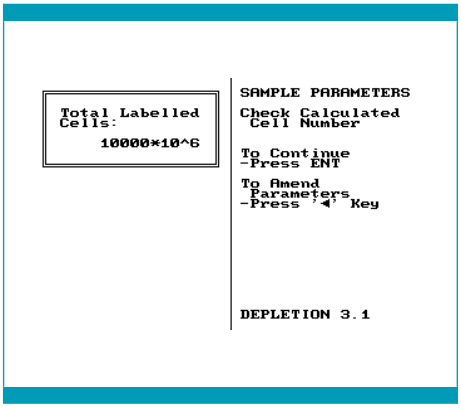
  Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

  Je možné vykonať opravu údajov. Na návrat na predchádzajúcu obrazovku na účely opravy stlačte tlačidlo ◄.

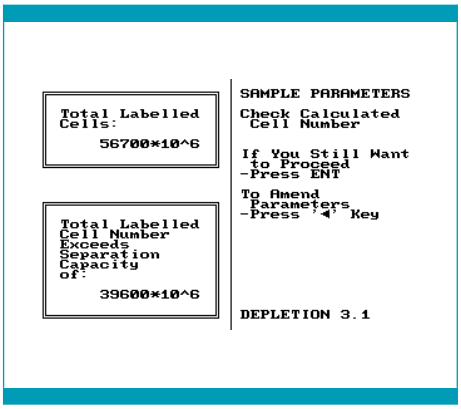
- Ak vypočítaný počet označených buniek prekročí separačnú kapacitu systému CliniMACS Plus, zobrazí sa obrazovka podobná Obrazovka 7.30. Uistite sa, či boli zadané správne parametre vzorky a či bol vypočítaný správny počet buniek. Stlačením tlačidla ◄ sa vráťte na predchádzajúcu obrazovku a opravte parametre vzorky.

- Aby nedošlo k preťaženiu systému, vzorku rozdeľte a stanovte objem jednotlivých častí. Stlačením tlačidla ◄ sa vráťte na predchádzajúcu Obrazovka 7.28. Zadajte parametre vzorky pre prvú alikvotnú časť vzorky a pokračujte separáciou tejto časti. Po dokončení separácie začnite druhú separáciu s druhou alikvotnou časťou pomocou novej súpravy hadičiek.

  Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrazovka 7.29: Výber súpravy hadičiek



Obrazovka 7.30: Výpočet: Počet buniek prekračuje separačnú kapacitu

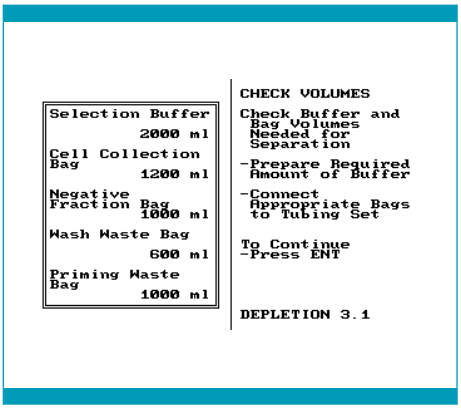
Informácie o objeme

Z celkového počtu označených buniek (pozrite si časť „Výpočet“) softvér vypočíta počet separačných stupňov, množstvo tlmivého roztoku potrebného na celé ochudobňovanie a objemy kvapaliny, ktoré budú zhromaždené vo vakoch Cell Collection Bag, Non-Target Cell Bag a Reapplication Bag.

DÔLEŽITÉ

- Vak Negative Fraction Bag zodpovedá vaku Non-Target Cell Bag.
- Vak Priming Waste Bag zodpovedá vaku Reapplication Bag.

Ak jedna z vypočítaných hodnôt prekročí uvedené štandardné hodnoty, objaví sa obrazovka podobná Obrazovka 7.31 informujúca o množstve kvapaliny, ktoré bude potrebné a ktoré sa nahromadí počas separačného procesu. Ak je potrebná výmena, vymeňte vaky dodané so súpravou hadičiek za alternatívne vaky vhodnej veľkosti. Vaky pôvodne pripojené k súprave hadičiek sú pripojené pomocou spojok luer. Vaky, ktorými sa nahradia pôvodné vaky, musia mať zásuvkový konektor typu luer (female luer). Štandardné vaky možno pripojiť pomocou spojky Luer/Spike Interconnector.



Obrazovka 7.31: Kontrola objemov

1. Skontrolujte, či je k dispozícii požadované množstvo tlmivého roztoku. Na jeden vešiak na vaky nedávajte viac než tri litre tlmivého roztoku.

   POZNÁMKA

   Existuje riziko poškodenia prístroja. Preťaženie vešiakov na vaky môže prístroj poškodiť. Nosnosť jedného vešiaka na vaky je 3 kg. Vešiaky na vaky nepreťažujte.

2. Za sterilných podmienok otvorte zásobník súpravy hadičiek a v prípade potreby nahraďte pôvodné vaky väčšími. Zaistite neobmedzený prietok do týchto vakov.

3. Ak je potrebná výmena, vymeňte vak Cell Collection Bag zo súpravy hadičiek za transferový vak dostatočnej veľkosti. Stanovte hmotnosť nového prázdneho vaku Cell Collection Bag a hmotnosť zaznamenajte. Uistite sa, že je možný neobmedzený prietok do vaku Cell Collection Bag. Alternatívne môžete k prvému vaku Cell Collection Bag pripojiť ďalší 600 mL transferový vak, napr. pomocou súpravy na prenos plazmy.

   ### DÔLEŽITÉ

   - Uistite sa, že je k dispozícii požadované množstvo tlmivého roztoku a objem vakov, ktorý uvádza Obrazovka 7.31, je dostatočný. V opačnom prípade bude ohrozená účinnosť separácie.

- Akúkoľvek úpravu súprav hadičiek CliniMACS je potrebné vykonať za sterilných podmienok, napr. v digestore s laminárnym prúdením.
- Pri ďalšej analýze alebo spracovaní buniek majte na pamäti, že objemy, ktoré uvádza Obrazovka 7.31, nie sú presné, sú to objemy vyhovujúce bezpečnostným požiadavkám.

4. Skontrolujte spojky luer lock na stĺpcoch. Spojky luer lock musia byť pevne uzavreté.

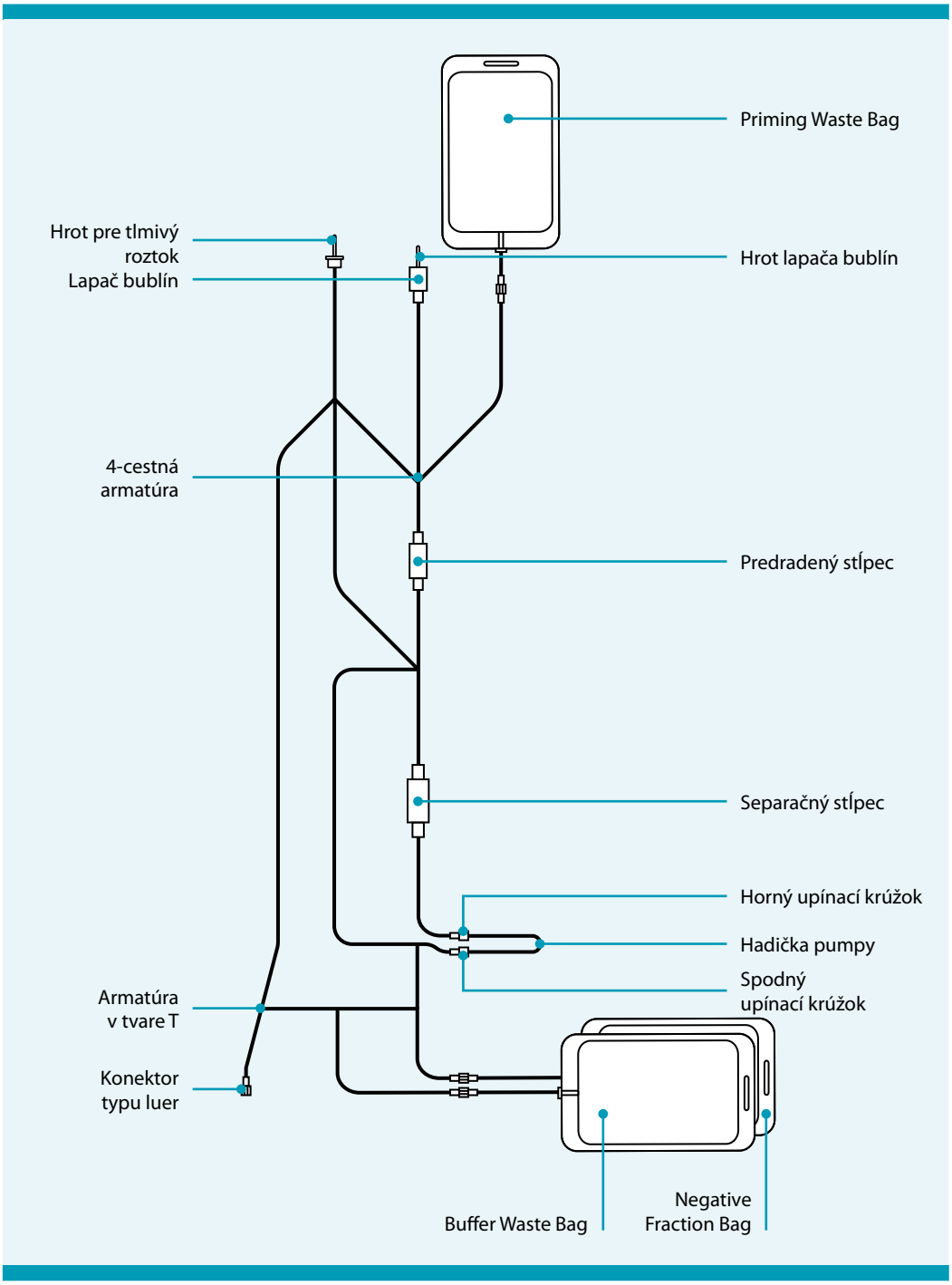
Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Program automaticky pokračuje podľa pokynov na inštaláciu súpravy hadičiek na prístroj.

▶ **Prejdite na KROK 3.**

7.3 KROK 3: Inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

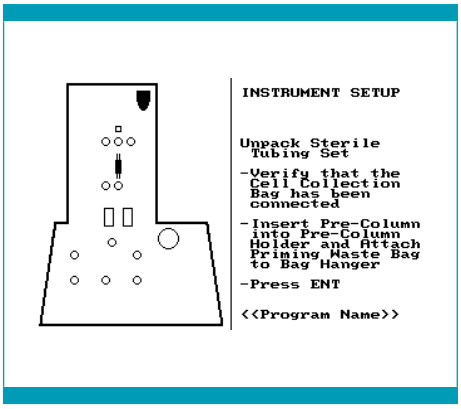
7.3.1 Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS



Obrázok 7.2: Všeobecná konštrukcia súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set (napr. CliniMACS Tubing Set).

Príprava na inštaláciu súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.32.



Obrazovka 7.32: Vybalenie súpravy hadičiek

Vpravo je zobrazený príslušný pokyn a na ľavej strane obrazovky diagram zodpovedajúci danému pokynu. Blikajúce prvky na obrazovke označujú miesta, ktorým je potrebné venovať pozornosť.

Súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set a CliniMACS Tubing Set LS sú dodávané v zatavených sterilizovaných obaloch. Každá súprava hadičiek obsahuje vopred zostavené hadičky a stĺpce na jednu separáciu buniek (pozrite si Obrázok 7.2). Ak je obal neporušený, je zabezpečená sterilná dráha tekutiny.

⚠ VAROVANIE

Riziko kontaminácie. Poškodený obal znamená, že súprava hadičiek už nemusí byť sterilná, a preto sa nesmie používať. Obal dôkladne skontrolujte, či nie je poškodený, prepichnutý alebo natrhnutý. Súpravu hadičiek používajte iba v prípade, ak je obal nepoškodený a zatavený.

Poznámka: V spodnom riadku obrazovky prístroj CliniMACS Plus Instrument zobrazuje názov zvoleného programu, napríklad CD34 SELECTION 1. V ktoromkoľvek kroku počas inštalácie súpravy hadičiek je možné stlačiť tlačidlo „Undo“ (Vrátiť späť) (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument) pre návrat k predchádzajúcemu kroku.

1. Zaznamenajte číslo šarže a dátum najneskoršej spotreby súpravy hadičiek.

   Vybaľte sterilnú súpravu hadičiek za sterilných podmienok (napr. v digestore s laminárnym prúdením). Pred použitím súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set LS odstráňte upínaciu svorku použitú na zabalenie súpravy. Svorka je označená nápisom „Remove before assembly to CliniMACS Plus Instrument” (Odstrániť pred montážou k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

2. Skontrolujte prípojky luer lock na pripojenie k vakom. Spojky luer lock musia byť pevne uzavreté.

Pripojenie vaku Cell Collection Bag

1. Zaznamenajte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag.
2. V aseptickom prostredí odstráňte uzávery a pred vložením súpravy hadičiek do prístroja CliniMACS Plus Instrument pripojte sterilný vak Cell Collection Bag vybavený prepojovacím konektorom Luer/Spike Interconnector. Uistite sa, že pôvodná hadička vaku Cell Collection Bag je buď zasvorkovaná, alebo zatavená.

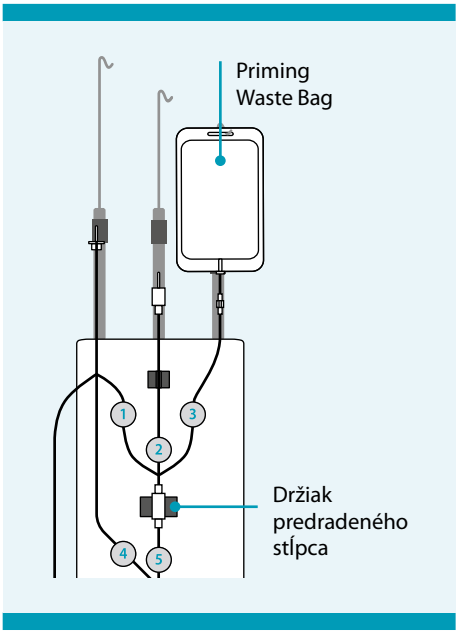
   Ak je na separáciu potrebný viac než jeden vak Cell Collection Bag, vaky prepojte pomocou súpravy na prenos plazmy. Uistite sa, že sú všetky prípojky pevne uzavreté.
3. Uistite sa, že je možný neobmedzený prietok do vaku Cell Collection Bag.
4. Pokračujte v inštalácii súpravy hadičiek buď podľa postupu uvedeného nižšie, alebo podľa postupu „Alternatívna inštalácia pre súpravy hadičiek CliniMACS".

Pripojenie vaku Priming Waste Bag a vloženie predradeného stĺpca

Okno označuje Obrazovka 7.32.

1. Pripojte vak Priming Waste Bag k pravému vešiaku na vaky na prístroji (pozrite si Obrázok 7.3).
2. Upravte výšku vešiaka na vaky. Zdvihnite alebo spusťte vešiak na vaky tak, aby sa jeho výška prispôsobila veľkosti vaku Priming Waste Bag. Uistite sa, že je dostatočne vysoko, aby sa zabránilo nadmernému ohnutiu hadičky, ktoré by mohlo obmedzovať prietok, a že je zároveň dostatočne nízko, aby nedošlo k natiahnutiu hadičky alebo prípojok.
3. Umiestnite predradený stĺpec do držiaka (pozrite si Obrázok 7.3).

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrázok 7.3: Pripojenie vaku Priming Waste Bag k vešiaku na vaky

Vloženie separačného stĺpca a vloženie hadičky do ventilu č. 5

Okno označuje Obrazovka 7.33.

Ventily znázornené na obrazovke čiernou farbou sa otvoria automaticky, čím sa uľahčí vkladanie hadičiek.

1. Vložte separačný stĺpec do držiaka separačného stĺpca (pozrite si Obrázok 7.4).

   ⚠ VAROVANIE

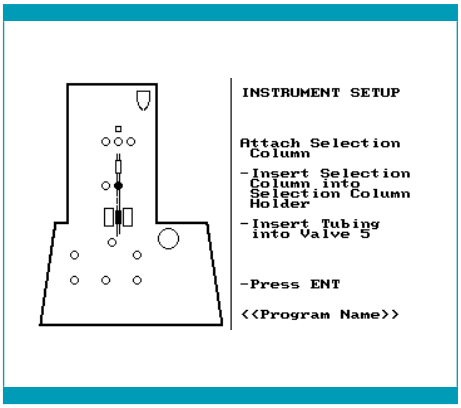
   Riziko zranenia. V prípade vloženia alebo vybratia separačného stĺpca pri zapnutej magnetickej jednotke existuje riziko poranenia osôb. Separačný stĺpec vkladajte alebo vyberajte iba vtedy, keď je magnetická jednotka vypnutá.

2. Vložte hadičku do ventilu č. 5.

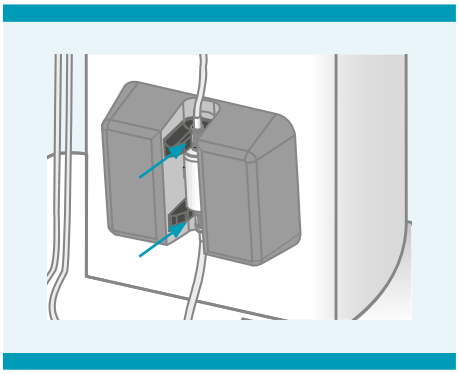
DÔLEŽITÉ

- Pri jednotlivých krokoch prekontrolujte všetky hadičky a nadstavce, či nie sú zalomené alebo nadmerne ohnuté, čím by sa mohol obmedziť prietok kvapaliny cez hadičky. Skontrolujte všetky ventily, aby bolo zaistené, že hadičky pevne sedia.
- Súpravu hadičiek vkladajte iba do otvorených ventilov (keď je tlačidlo zatlačené dovnútra). Ak sa hadička vloží do uzavretého ventilu, nezapadne správne.
- Ak je potrebné hadičku upraviť po uzatvorení ventilu, hadičku nevyťahujte bez stlačenia tlačidla ventilu na otvorenie ventilu (pozrite si Obrázok 7.5).

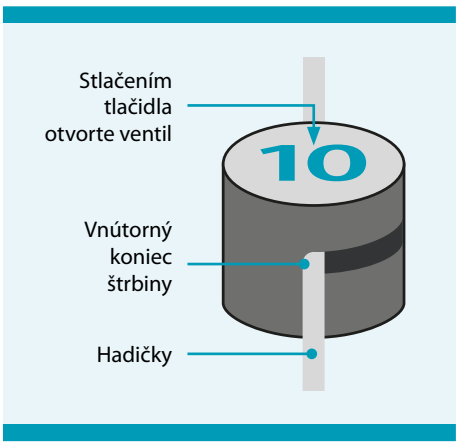
Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrazovka 7.33: Vloženie separačného stĺpca a vloženie hadičky do ventilu č. 5



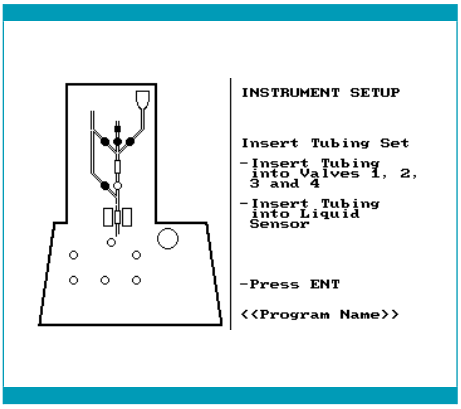
Obrázok 7.4: Separačný stĺpec v držiaku separačného stĺpca



Obrázok 7.5: Správne vložená hadička

Vloženie hadičiek do ventilov č. 1, 2, 3 a 4

Okno označuje Obrazovka 7.34.



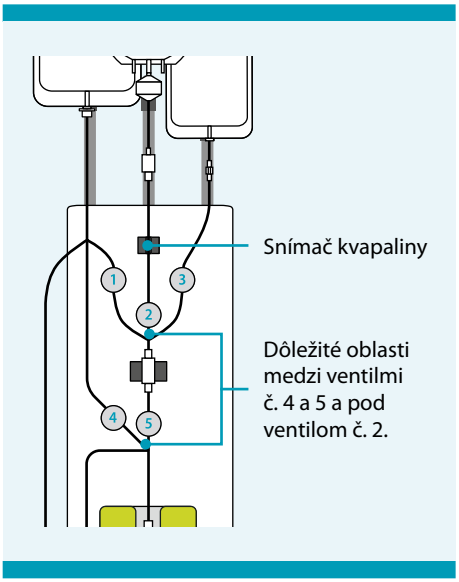
Obrazovka 7.34: Vloženie hadičiek do ventilov č. 1, 2, 3, 4 a snímač kvapaliny

1. Vložte hadičku do ventilu č. 4. Uistite sa, že je hadička bezpečne umiestnená v otvore ventilu (pozrite si Obrázok 7.5). Venujte osobitnú pozornosť priestoru medzi ventilmi č. 4 a 5 (pozrite si Obrázok 7.6) a udržujte štvorcestnú armatúru vo zvislej polohe.
2. Vložte hadičku do ventilu č. 1.
3. Umiestnite 4-cestnú armatúru tesne pod ventil č. 2. Venujte osobitnú pozornosť priestoru medzi ventilom č. 2.
4. Vložte hadičku do ventilov č. 2 a 3.
5. Namontujte hadičku medzi ventil č. 2 a lapač bublín do snímača kvapaliny. Uistite sa, že je hadička správne umiestnená v armatúre snímača.

DÔLEŽITÉ

Snímač kvapaliny aj vkladaná hadička musia byť suché, aby sa zabezpečila správne fungovanie. Dôkladne ich skontrolujte. Ak sa v blízkosti nachádza akákoľvek kvapalina, miesto vysušte mäkkou handričkou nepúšťajúcou vlákna.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

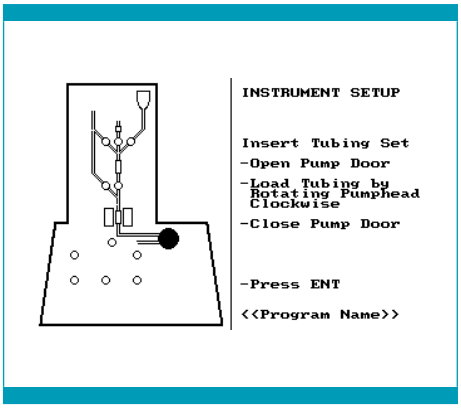


Obrázok 7.6: Hadičky vo ventiloch

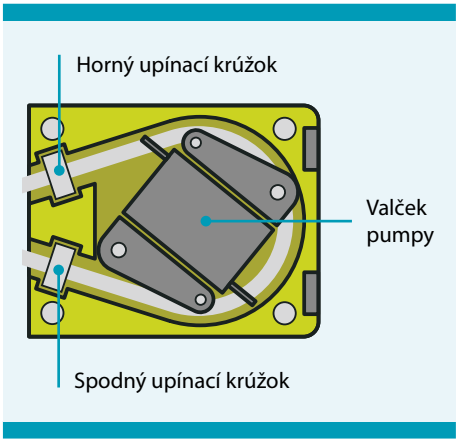
Vloženie hadičky do pumpy

Okno označuje Obrazovka 7.35.

1. Otvorte dvierka pumpy nadvihnutím za ľavý okraj.
2. Vložte horný upínací krúžok na hadičke pumpy do drážky upínacieho krúžku na telese pumpy (pozrite si Obrázok 7.7).
3. Otáčajte valčekom pumpy v smere hodinových ručičiek, až kým sa hadička nezavedie medzi obe súpravy vodiacich kolíkov hadičky a hadička tesne neobopne valček pumpy. Uistite sa, že hadička nie je na konci vodiacich kolíkov stlačená. Ak je potrebné upraviť hadičku vo vnútri pumpy, hadičku možno odľahčiť zdvihnutím spodného konca a otočením valčeka pumpy proti smeru hodinových ručičiek.
4. Vložte spodný upínací krúžok na hadičke pumpy do drážky upínacieho krúžku na telese pumpy.
5. Otáčajte valčekom pumpy v smere a proti smeru hodinových ručičiek, aby ste sa uistili, že sa valček pumpy voľne pohybuje.
6. Zavrite dvierka pumpy.



Obrazovka 7.35: Vloženie hadičky do pumpy



Obrázok 7.7: Vloženie hadičky do pumpy

DÔLEŽITÉ

Počas programu separácie buniek sa pri každom otvorení krytu pumpy okamžite zastaví činnosť pumpy. Ak zostane otvorený dlhšie než 600 sekúnd, prístroj preruší práve prebiehajúcu operáciu.

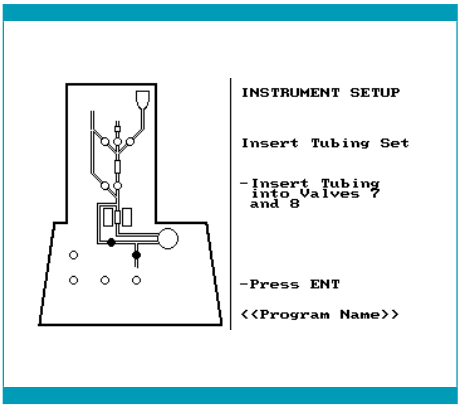
Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Vloženie hadičiek do ventilov č. 7 a 8

Okno označuje Obrazovka 7.36.

1. Vložte hadičku do ventilu č. 7.
2. Vložte hadičku do ventilu č. 8.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



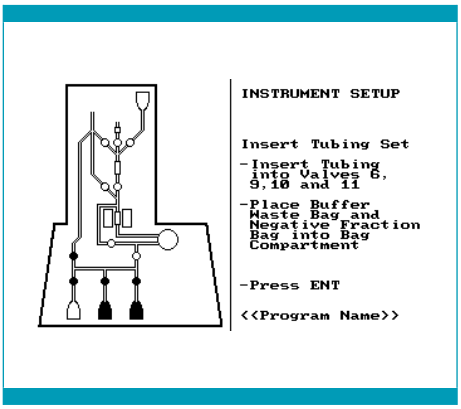
Obrazovka 7.36: Vloženie hadičiek do ventilov č. 7 a 8

Vloženie hadičiek do ventilov č. 6, 9, 10 a 11

Okno označuje Obrazovka 7.37.

1. Vložte hadičky do ventilov č. 6, 9, 10 a 11.
2. Do priehradky na vaky umiestnite vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Uistite sa, že pod vekom priehradky na vaky nie sú hadičky stlačené.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrazovka 7.37: Vloženie hadičiek do ventilov č. 6, 9, 10 a 11

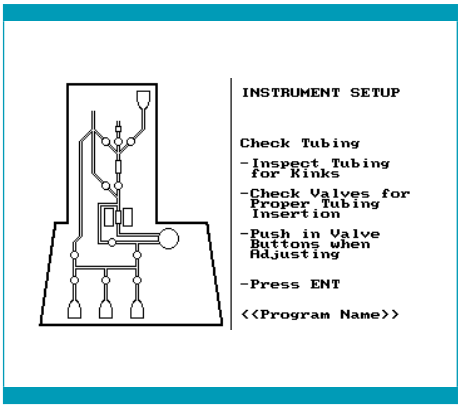
Opätovná kontrola všetkých hadičiek a nadstavcov

Okno označuje Obrazovka 7.38.

Pred začatím separácie buniek znova skontrolujte všetky hadičky a nadstavce.

Poznámka: Skontrolujte všetky ventily, či majú správne zasunuté hadičky. Uistite sa, že sú hadičky rovnomerne rozmiestnené a nie sú zalomené ani natiahnuté. Venujte osobitnú pozornosť priestoru pred predradeným stĺpcom, ako aj priestoru medzi pumpou a ventilmi č. 7 a 8 (pozrite si Obrázok 7.8) a medzi ventilmi č. 4 a 5 (pozrite si Obrázok 7.6). Ak je potrebné hadičku upraviť po uzatvorení ventilu, hadičku nevyťahujte bez stlačenia tlačidla ventilu na otvorenie ventilu. Ak bola poloha hadičky upravená, je bezpodmienečne nutné dvakrát silno stlačiť príslušné ventily.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



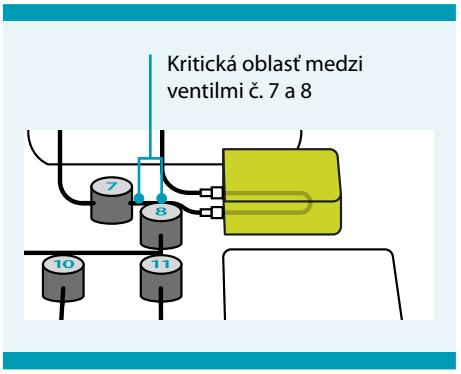
Obrazovka 7.38: Opätovná kontrola všetkých hadičiek a nadstavcov

Usadenie ventilov

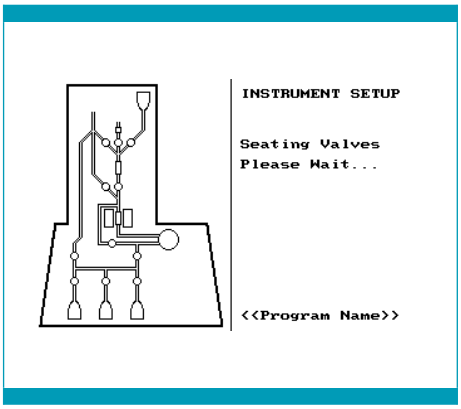
Okno označuje Obrazovka 7.39.

Na zabezpečenie správneho usadenia hadičiek vo ventiloch bude prístroj postupne za sebou ovládať všetky ventily, a to dvakrát. Pozorujte a počúvajte, aby ste sa uistili, že všetky ventily fungujú správne. Ak niektorý z ventilov nefunguje správne, pozrite si kapitolu 8 „Riešenie problémov“ na strane 211. Tento krok je možné zopakovať stlačením ◄ a potom stlačením tlačidla **ENT** (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

V priebehu tejto kontrolnej sekvencie sa tiež otestuje magnetický pohon.



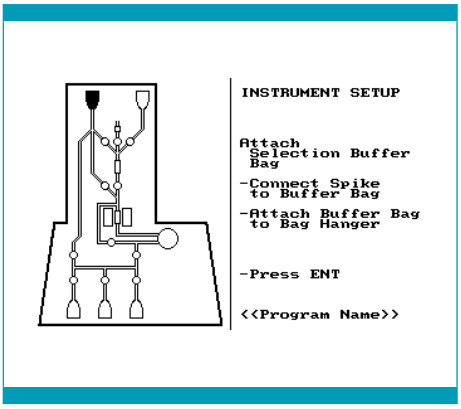
Obrázok 7.8: Hadičky vo ventiloch



Obrazovka 7.39: Usadenie ventilov

Pripojenie tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Okno označuje Obrazovka 7.40.



Obrazovka 7.40: Pripojenie vaku na tlmivý roztok

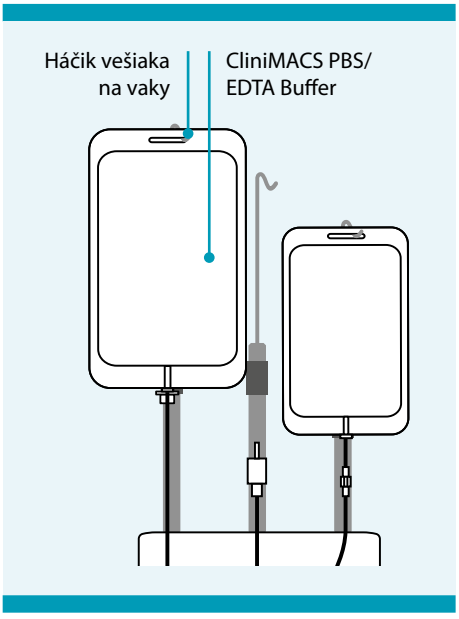
Predpísaným tlmivým roztokom na separácie buniek pomocou systému CliniMACS Plus je tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer doplnený o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

1. Použitím aseptických postupov odstráňte uzáver z hrotu pre tlmivý roztok na súprave hadičiek (pozrite si Obrázok 7.2 na strane 156) a pripojte ho k vaku s tlmivým roztokom. Uistite sa, že je membrána prepichnutá, čo umožní voľný prietok kvapaliny. Vak opatrne stlačte, aby ste sa uistili, že hrot prenikol do vaku.

   Ak je potrebné na separáciu použiť viac než jeden liter tlmivého roztoku, prepojte dva vaky s tlmivým roztokom pomocou súpravy na prenos plazmy.

2. Pripojte vak s tlmivým roztokom na háčik vešiaka na vaky s tlmivým roztokom (pozrite si Obrázok 7.9).

3. Upravte výšku vešiaka na vaky s tlmivým roztokom. Zdvihnite alebo spusťte vešiak na vaky tak, aby sa jeho výška prispôsobila veľkosti vaku s tlmivým roztokom. Uistite sa, že je dostatočne vysoko, aby sa zabránilo nadmernému ohnutiu hadičky, ktoré by mohlo obmedzovať prietok, a že je zároveň dostatočne nízko, aby nedošlo k natiahnutiu hadičky alebo prípojok.



Obrázok 7.9: Pripojenie vaku na tlmivý roztok

POZNÁMKA

Existuje riziko poškodenia prístroja. Preťaženie vešiakov na vaky môže prístroj poškodiť. Nosnosť jedného vešiaka na vaky je 3 kg. Vešiaky na vaky nepreťažujte.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

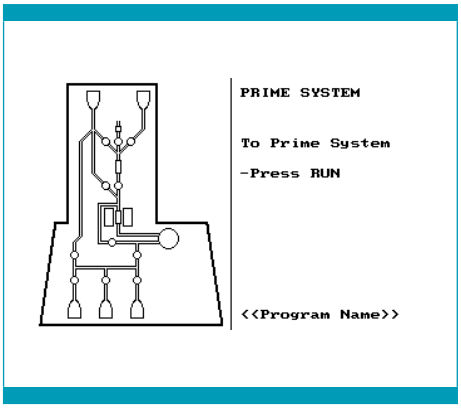
Spustenie plnenia

Okno označuje Obrazovka 7.41.

Na spustenie plnenia stlačte tlačidlo **RUN**.

Okno označuje Obrazovka 7.42.

Počas fázy plnenia sa súprava hadičiek naplní tlmivým roztokom. Tlmivý roztok bude cirkulovať cez súpravu hadičiek vrátane predradeného stĺpca a separačného stĺpca. Odpad z plnenia sa zhromažďuje vo vakoch Priming Waste Bag a Buffer Waste Bag (pozrite si Obrázok 7.2 na strane 156). Cykly plnenia budú pokračovať a budú sa opakovať série krokov. Fáza plnenia potrvá približne 1 minútu. Stav plnenia sa bude aktualizovať na displeji.



Obrazovka 7.41: Spustenie plnenia

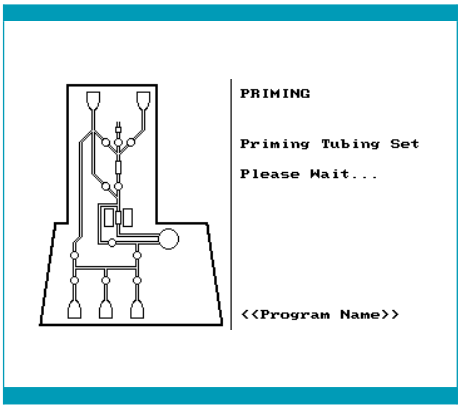
Kontrola počas plnenia

Počas fázy plnenia kontrolujte všetky hadičky, armatúry, ventily a stĺpce, či sa nevyskytujú nejaké netesnosti alebo záhyby, ktoré by mohli blokovať prietok kvapaliny.

Ak spozorujete netesnosti alebo poruchy, zastavte prevádzku stlačením tlačidla **STOP**.

Operátor bude mať 600 sekúnd na vyriešenie problému.

Obnovte proces stlačením tlačidla **RUN**.



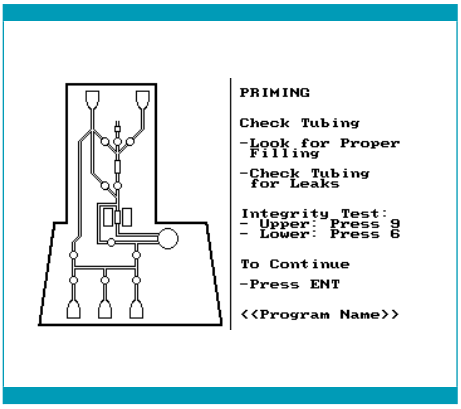
Obrazovka 7.42: Priebeh plnenia

Po 600 sekundách bude separácia zrušená. Ak operátor nedokáže vyriešiť problém alebo ak je súprava hadičiek chybná, súpravu hadičiek vyberte a nahraďte novou.

Poznámka: Po spustení plnenia nie je možný návrat k postupu nastavenia prístroja.

Finálna kontrola všetkých hadičiek a nadstavcov

Okno označuje Obrazovka 7.43.



Obrazovka 7.43: Finálna kontrola hadičiek

Pred pokračovaním programu skontrolujte nasledovné:

- tekutina vo všetkých častiach súpravy hadičiek (okrem filtra Pre-System Filter)
- žiadny nadbytočný vzduch v súprave hadičiek
- tekutina vo vakoch Priming Waste Bag a Buffer Waste Bag
- žiadna tekutina vo vakoch Negative Fraction Bag alebo Cell Collection Bag

Nestláčajte zatiaľ tlačidlo ENT.

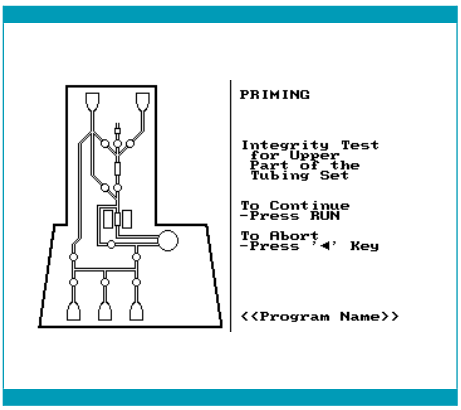
Test integrity

Na zvýšenie bezpečnosti je potrebné vykonať test integrity, aby sa otestovala tesnosť súpravy hadičiek. Testovacia sekvencia sa skladá z dvoch automatických sekvencií, ktoré umožňujú samostatne natlakovať a pozorovať hornú aj dolnú časť súpravy hadičiek.

Test integrity hornej časti súpravy hadičiek

1. Keď operátor vykonáva postup „finálnej kontroly všetkých hadičiek a nadstavcov“, v okne sa zobrazí Obrazovka 7.43.
2. Po vykonaní postupu „finálnej kontroly všetkých hadičiek a nadstavcov“ pokračujte vo vykonávaní testu integrity. **Nestláčajte** tlačidlo ENT.
3. Na vykonanie testu integrity hornej časti stlačte tlačidlo **9**.

   Okno označuje Obrazovka 7.44.



Obrazovka 7.44: Spustenie testu integrity pre hornú časť

4. Na spustenie testovacej sekvencie stlačte tlačidlo **RUN**.

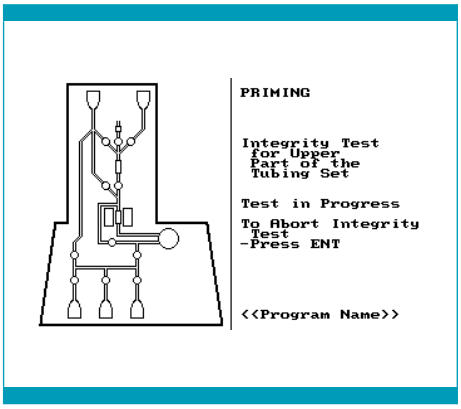
   Na návrat na Obrazovka 7.43 stlačte tlačidlo ◄.

5. Po stlačení tlačidla RUN spustí prístroj automatickú testovaciu sekvenciu pre hornú časť súpravy hadičiek.

   Okno označuje Obrazovka 7.45.

   Vznikne pretlak, ktorý sa bude udržiavať po dobu dvoch minút. Počas tejto doby by operátor mal sledovať všetky pripojenia nad horným pripojením hadičiek pumpy.

   Testovaciu sekvenciu je možné v každom bode ukončiť stlačením tlačidla ENT.



Obrazovka 7.45: Priebeh testu integrity hornej časti

6. Po uplynutí dvoch minút sa tlak automaticky uvoľní a v okne sa zobrazí Obrazovka 7.43.

   Skontrolujte, či sa počas testovacej sekvencie neobjavili netesnosti. Ak sa na ktorejkoľvek prípojke súpravy hadičiek objaví netesnosť, súpravu hadičiek je potrebné odstrániť a nahradiť novou. Pokyny na vrátenie chybnej súpravy hadičiek získate od technickej podpory Miltenyi Biotec Technical Support.

7. Ak nezaznamenáte žiadne netesnosti, pokračujte testom integrity dolnej časti súpravy hadičiek.

Test integrity dolnej časti súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.46.

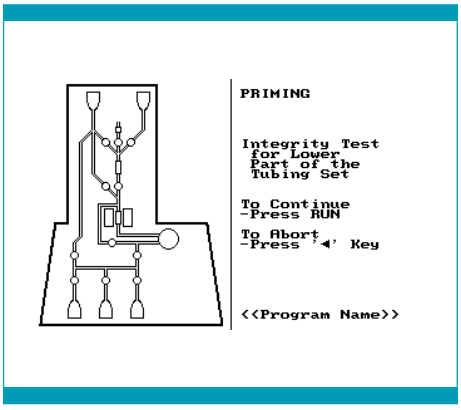
1. Na vstup do testu integrity dolnej časti stlačte tlačidlo 6.
   Nestláčajte tlačidlo ENT.

   Okno označuje Obrazovka 7.46.

2. Na spustenie testovacej sekvencie stlačte tlačidlo RUN.

   Na návrat na Obrazovka 7.43 stlačte tlačidlo ◄.

3. Po stlačení tlačidla RUN spustí prístroj automatickú testovaciu sekvenciu pre dolnú časť súpravy hadičiek.

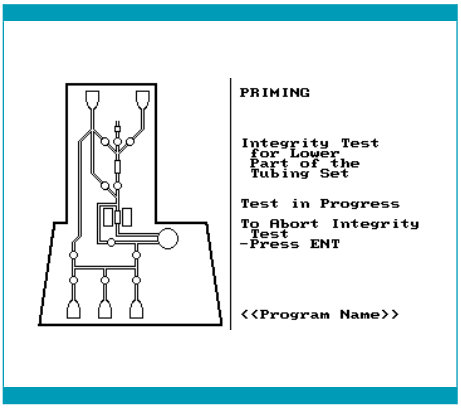


Obrazovka 7.46: Spustenie testu integrity pre dolnú časť

Okno označuje Obrazovka 7.47.

Vznikne pretlak, ktorý sa bude udržiavať po dobu 30 sekúnd. Počas tejto doby by operátor mal sledovať dolnú prípojku hadičiek pumpy a armatúry v tvare T medzi ventilmi č. 6, 8, 9, 10 a 11.

Testovaciu sekvenciu je možné v každom bode ukončiť stlačením tlačidla ENT.



Obrazovka 7.47: Priebeh testu integrity dolnej časti

4. Po uplynutí 30 sekúnd sa tlak automaticky uvoľní a v okne sa zobrazí Obrazovka 7.43.

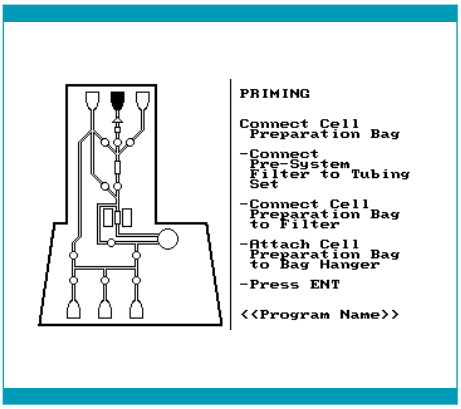
   Skontrolujte, či sa počas testovacej sekvencie neobjavili netesnosti. Ak sa na ktorejkoľvek prípojke súpravy hadičiek objaví netesnosť, súpravu hadičiek je potrebné odstrániť a nahradiť novou. Pokyny na vrátenie chybnej súpravy hadičiek získate od technickej podpory Miltenyi Biotec Technical Support.

5. Ak operátor nezaznamená žiadne netesnosti, môže pokračovať v nasledujúcom kroku stlačením tlačidla ENT.

Pripojenie vaku Cell Preparation Bag

Okno označuje Obrazovka 7.48.

Pripojte vak Cell Preparation Bag obsahujúci označený bunkový produkt:



Obrazovka 7.48: Pripojenie vaku Cell Preparation Bag

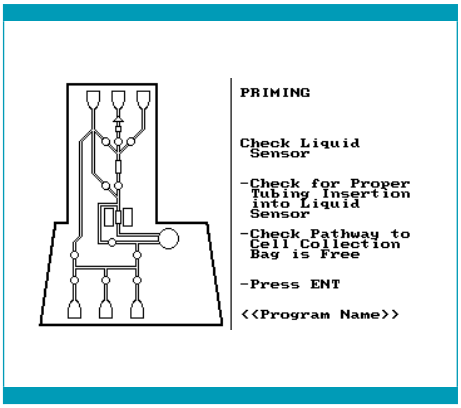
1. Odstráňte uzáver z hrotu lapača bublín súpravy hadičiek (pozrite si Obrázok 7.2).
2. Odstráňte uzáver z tupého konca filtra Pre-System Filter (pozrite si Obrázok 7.10). Hrot pevne zasuňte do filtra Pre-System Filter.
3. Odstráňte uzáver z hrotu filtra Pre-System Filter.
4. Hrot filtra Pre-System Filter zasuňte do nepoužitého portu vaku Cell Preparation Bag, pričom sa uistite, že došlo k prepichnutiu membrány, aby sa umožnil voľný prietok kvapaliny. Vak opatrne stlačte, aby ste sa uistili, že hrot prenikol do vaku.
5. Dôkladne skontrolujte pripojenie medzi filtrom Pre-System Filter a súpravou hadičiek, aby sa potvrdila bezpečnosť pripojenia.
6. Vak Cell Preparation Bag zaveste na stredný vešiak na vaky.
7. Upravte držiak na vaky pre vak Cell Preparation Bag tak, aby udržoval vak Cell Preparation Bag vo zvislej polohe.

Pokračujte stlačením tlačidla ENT.

Finálna kontrola snímača kvapaliny

Okno označuje Obrazovka 7.49.

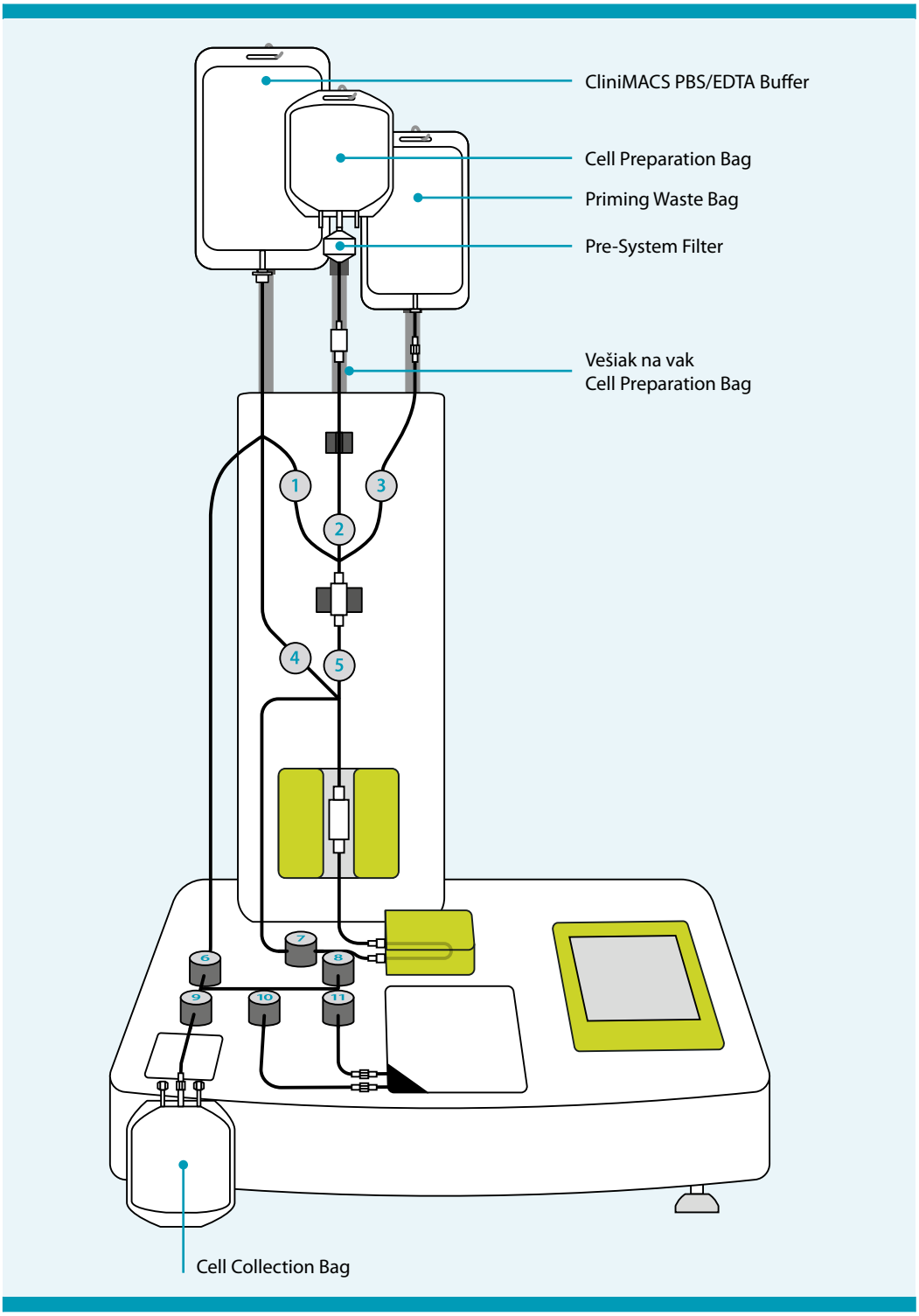
1. Skontrolujte hadičku snímača kvapaliny. Uistite sa, že je hadička správne vložená, že neobsahuje žiadnu vonkajšiu kvapalinu a že sa počas postupu nakladania nevysunula.
2. Skontrolujte, či je umožnený neobmedzený prietok do vaku Cell Collection Bag (napr. otvorená svorka pod ventilom 9).



Obrazovka 7.49: Finálna kontrola snímača kvapaliny

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

▶ **Prejdite na KROK 4.**



Obrázok 7.10: Prístroj CliniMACS Plus Instrument so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set, činidlom CliniMACS PBS/EDTA Buffer, vakom Cell Preparation Bag a vakom Cell Collection Bag

7.3.2 Alternatívna inštalácia súprav hadičiek CliniMACS

Pokyny uvedené v KROKU 3 a obrazovky zobrazené prístrojom CliniMACS Plus Instrument opisujú inštaláciu súprav hadičiek CliniMACS za sterilných podmienok (čistá miestnosť).

Samotný systém CliniMACS Plus je uzatvorený systém, ktorý nemusí byť nevyhnutne prevádzkovaný v čistej miestnosti. Pokiaľ sa však systém neprevádzkuje v čistej miestnosti, je potrebné upraviť postup inštalácie súpravy hadičiek, aby bola zabezpečená sterilita procesu separácie buniek.

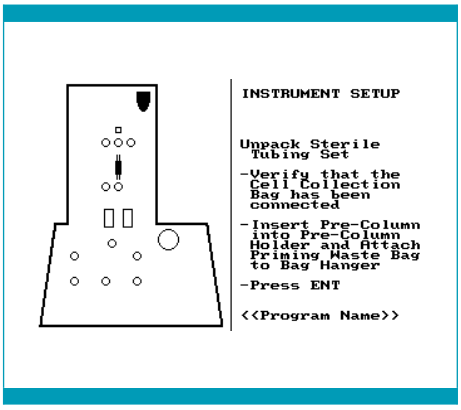
Sterilita procesu separácie buniek môže byť pri pripájaní vaku Cell Collection Bag, tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer, filtra Pre-System Filter a vaku Cell Preparation Bag narušená. Na zabezpečenie toho, aby zostal systém sterilný, je potrebné tieto komponenty pripojiť k súprave hadičiek za sterilných podmienok (napr. v digestore s laminárnym prúdením). Ak sa komponenty pripoja k súprave hadičiek pred inštaláciou na prístroj CliniMACS Plus Instrument, je potrebné zmeniť poradie pokynov dodaných prístrojom a pokynov v KROKU 3 a vykonať ďalšie kroky.

Pri prevádzkovaní prístroja CliniMACS Plus Instrument mimo čistej miestnosti postupujte v súlade s nasledujúcimi dodatočnými pokynmi, ktorými sa menia pokyny v KROKU 3.

Príprava na inštaláciu súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.50.

Pred inštaláciou súpravy hadičiek na prístroj treba v súlade s opisom pripojiť za sterilných podmienok k súprave hadičiek vak Cell Collection Bag, tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer, filter Pre-System Filter a vak Cell Preparation Bag.



Obrazovka 7.50: Vybalenie súpravy hadičiek

Vybaľte súpravu hadičiek za sterilných podmienok a pripojte nasledujúce komponenty za sterilných podmienok:

- **Pripojenie vaku Cell Collection Bag**

  Pozrite si stranu 158.

Pripojenie tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer

DÔLEŽITÉ

Pred pripojením tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer k súprave hadičiek zasvorkujte hadičku pod hrotom pre tlmivý roztok zaisťovacími kliešťami, aby sa pred inštaláciou zamedzilo vtekaniu tlmivého roztoku do súpravy hadičiek (pozrite si svorku 1, Obrázok 7.11 na strane 175).

Použitím aseptických postupov odstráňte uzáver z hrotu pre tlmivý roztok na súprave hadičiek a pripojte ho k vaku s tlmivým roztokom. Uistite sa, že je membrána prepichnutá, čo umožní voľný prietok kvapaliny. Vak opatrne stlačte, aby ste sa presvedčili, že hrot prenikol do vaku.

Pripojenie filtra Pre-System Filter

Odstráňte uzáver z hrotu lapača bublín. Odstráňte uzáver z dolného otvoru filtra Pre-System Filter.

Hrot pevne zasuňte do filtra Pre-System Filter. NEODSTRAŇUJTE horný uzáver filtra Pre-System Filter. Uzatvorte hadičku tesne pod lapačom bublín zaisťovacími kliešťami (pozrite si svorku 2, Obrázok 7.11 na strane 175). Tým zabránite tomu, aby sa pripravená bunková suspenzia vo vaku Cell Preparation Bag nedostala do filtra Pre-System Filter a do súpravy hadičiek.

Pripojenie vaku Cell Preparation Bag

Pripojte vak Cell Preparation Bag obsahujúci magneticky označené a premyté bunky k súprave hadičiek. Prepichnite vak Cell Preparation Bag s filtrom Pre-System Filter, pričom sa uistite, že došlo k prepichnutiu membrány, aby sa umožnil voľný prietok kvapaliny. Vak opatrne stlačte, aby ste sa presvedčili, že hrot prenikol do vaku.

Inštalácia na prístroj CliniMACS Plus Instrument

Zaveste vak na tlmivý roztok na ľavý vešiak na vaky, vak Cell Preparation Bag na stredný vešiak na vaky a vak Priming Waste Bag na pravý vešiak na vaky na prístroji.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

▶ Pripojenie vaku Priming Waste Bag a vloženie predradeného stĺpca

Pozrite si stranu 158.

▶ Vloženie separačného stĺpca a vloženie hadičky do ventilu č. 5

Pozrite si stranu 159.

▶ Vloženie hadičiek do ventilov č. 1, 2, 3 a 4

Pozrite si stranu 160.

▶ Vloženie hadičky do pumpy

Pozrite si stranu 161.

▶ Vloženie hadičiek do ventilov č. 7 a 8

Pozrite si stranu 162.

▶ Vloženie hadičiek do ventilov č. 6, 9, 10 a 11

Pozrite si stranu 162.

▶ Opätovná kontrola všetkých hadičiek a nadstavcov

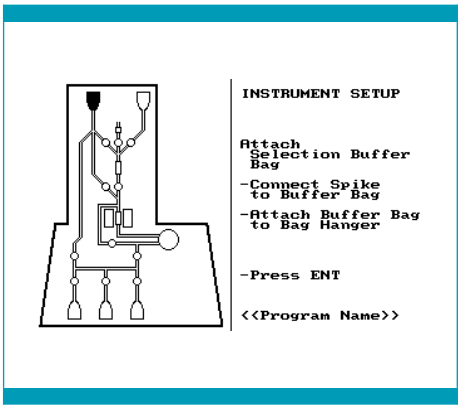
Pozrite si stranu 163.

▶ Usadenie ventilov

Pozrite si stranu 163.

Pripojenie tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer

Okno označuje Obrazovka 7.51.



Obrazovka 7.51: Pripojenie vaku na tlmivý roztok

1. Vak na tlmivý roztok bol pripojený počas postupu „Príprava na inštaláciu súpravy hadičiek“. Z tohto dôvodu môže byť potrebné upraviť len výšku vešiaka na vak s tlmivým roztokom. Zdvihnite alebo spusťte vešiak na vaky tak, aby sa jeho výška prispôsobila veľkosti vaku na tlmivý roztok, pričom zaistite, aby bola výška dostatočne veľká, aby nedošlo k nadmernému ohnutiu hadičky, ktoré by mohlo obmedziť prietok kvapaliny, a dostatočne nízka, aby nedošlo k natiahnutiu hadičky alebo prípojok.
2. Odstráňte zaisťovacie kliešte z hadičky tesne pod hrotom pre tlmivý roztok.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

▶ Spustenie plnenia

Pozrite si stranu 165.

▶ Kontrola počas plnenia

Pozrite si stranu 165.

▶ Finálna kontrola všetkých hadičiek a nadstavcov

Pozrite si stranu 166.

▶ Test integrity

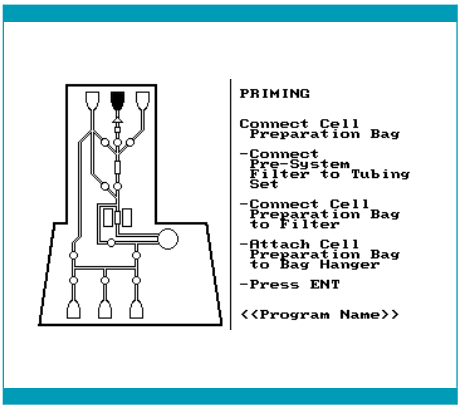
Pozrite si stranu 166.

Pripojenie vaku Cell Preparation Bag (a filter Pre-System Filter)

Okno označuje Obrazovka 7.52.

1. Vak Cell Preparation Bag a filter Pre-System Filter boli pripojené počas postupu „Príprava na inštaláciu súpravy hadičiek“.
2. Odstráňte zaisťovacie kliešte pod lapačom bublín.

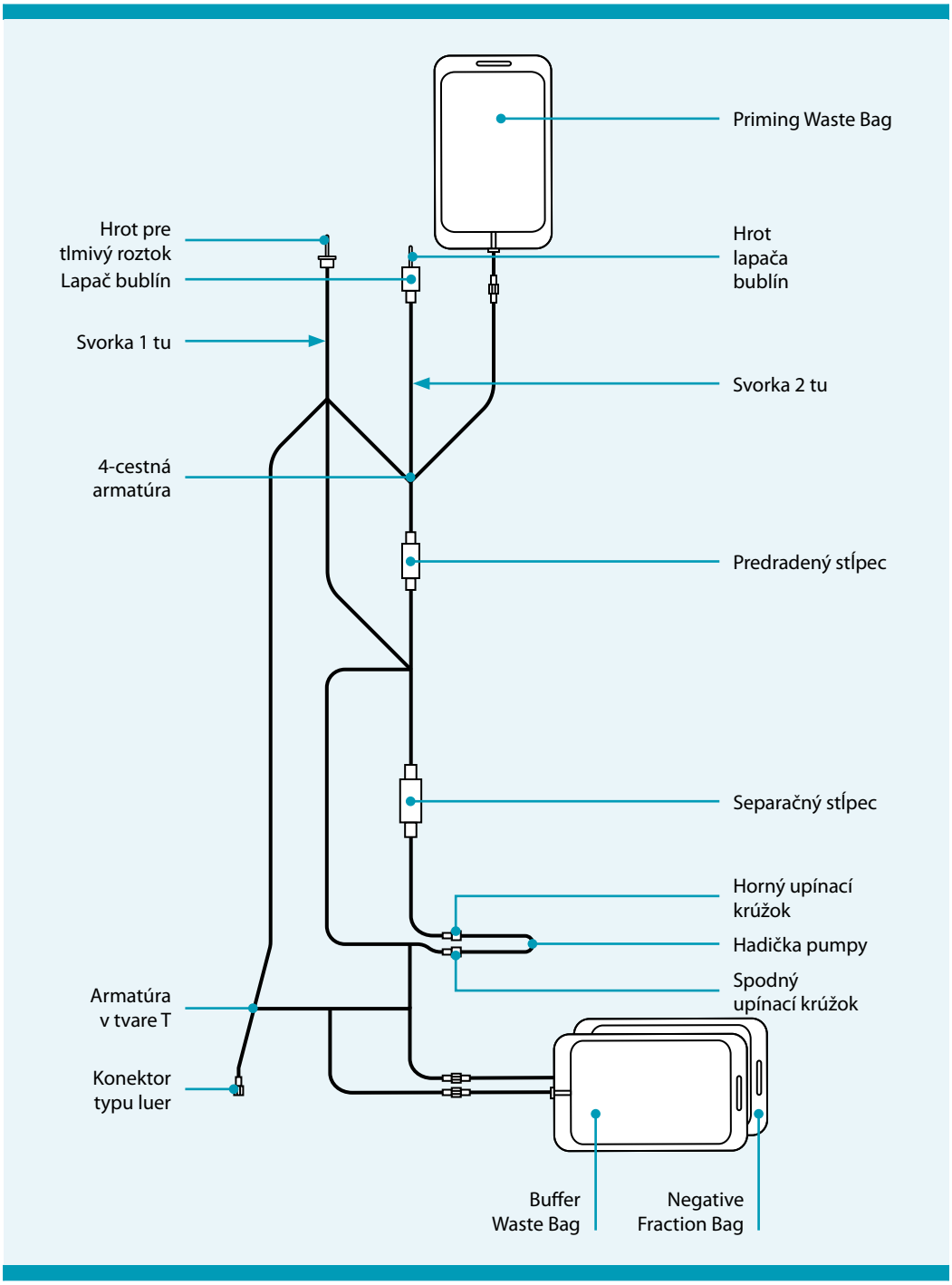
Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrazovka 7.52: Pripojenie vaku Cell Preparation Bag

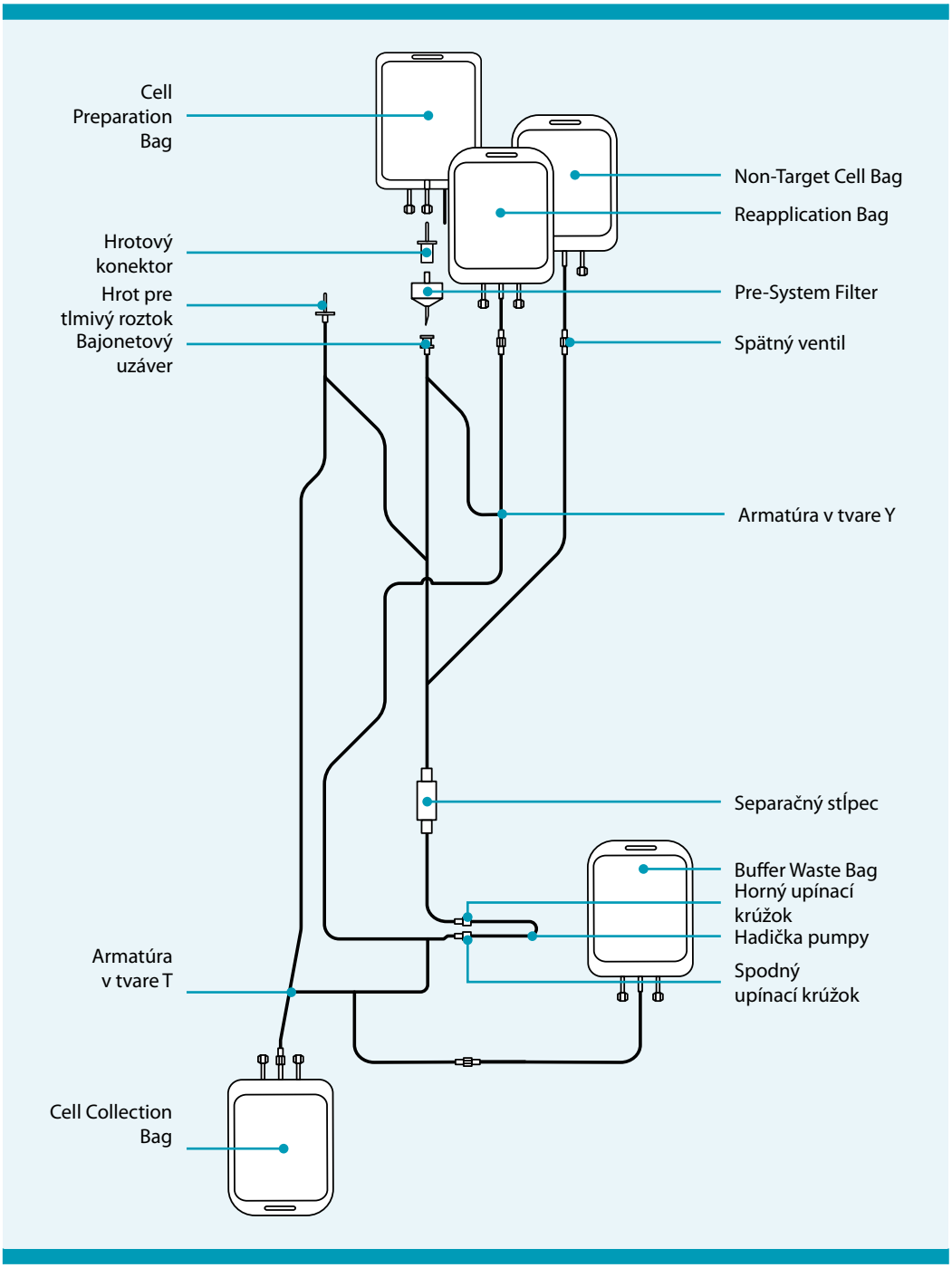
▶ Finálna kontrola snímača kvapaliny

Pozrite si stranu 169.



Obrázok 7.11: Všeobecná konštrukcia súpravy hadičiek CliniMACS Tubing Set (napr. CliniMACS Tubing Set) s polohami svoriek 1 a 2

7.3.3 Súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set

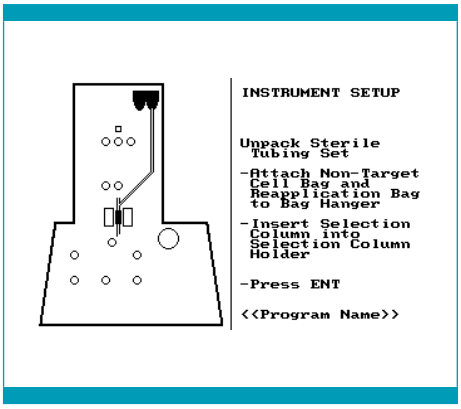


Obrázok 7.12: Všeobecná konštrukcia súpravy hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set

Príprava na inštaláciu súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.53.

Vpravo je zobrazený príslušný pokyn a vľavo je zobrazená schéma zodpovedajúca danému pokynu. Blikajúce prvky na obrazovke označujú miesta, ktorým je potrebné venovať pozornosť.



Obrazovka 7.53: Vybalenie súpravy hadičiek

Súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set sa dodáva v zatavenom sterilizovanom obale. Každá súprava hadičiek obsahuje vopred zostavené hadičky, stĺpec a vaky na jednu separáciu buniek (pozrite si Obrázok 7.12). Ak je obal neporušený, je zabezpečená sterilná dráha tekutiny.

Poznámka: V spodnom riadku obrazovky prístroj CliniMACS Plus Instrument zobrazuje názov zvoleného programu, napríklad DEPLETION 3.1. V ktoromkoľvek kroku počas inštalácie súpravy hadičiek je možné stlačiť tlačidlo„Undo“ (Vrátiť späť) (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument) pre návrat k predchádzajúcemu kroku.

1. Zaznamenajte číslo šarže a dátum najneskoršej spotreby súpravy hadičiek.

   Vybaľte sterilnú súpravu hadičiek za sterilných podmienok (napr. v digestore s laminárnym prúdením). Pred použitím súpravy hadičiek odstráňte upínaciu svorku použitú na zabalenie súpravy. Svorka je označená nápisom „Remove before assembly to CliniMACS Plus Instrument” (Odstrániť pred montážou k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

2. Skontrolujte prípojky luer lock na pripojenie k vakom. Spojky luer lock musia byť pevne uzavreté.

Cell Collection Bag

Súprava hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set sa dodáva s pripojeným vakom Cell Collection Bag. Zaznamenajte hmotnosť prázdneho vaku Cell Collection Bag. Ak je na separáciu potrebný viac než jeden vak Cell Collection Bag, vaky prepojte pomocou súpravy na prenos plazmy. Uistite sa, že sú všetky prípojky pevne uzavreté. Zaznamenajte hmotnosť prázdneho vaku (vakov) Cell Collection Bag.

Pripojenie vakov Non-Target Cell Bag a Reapplication Bag a vloženie separačného stĺpca

1. Pripojte vaky Non-Target Cell Bag a Reapplication Bag k pravému vešiaku na vaky na prístroji (pozrite si Obrázok 7.13).
2. Nastavte výšku vešiakov na vaky. Zdvihnite alebo spusťte vešiaky na vaky tak, aby sa ich výška prispôsobila veľkosti vakov Non-Target Cell Bag a Reapplication Bag. Uistite sa, že sú dostatočne vysoko, aby sa zabránilo nadmernému ohnutiu hadičky, ktoré by mohlo obmedzovať prietok, a že sú zároveň dostatočne nízko, aby nedošlo k natiahnutiu hadičiek alebo prípojok.

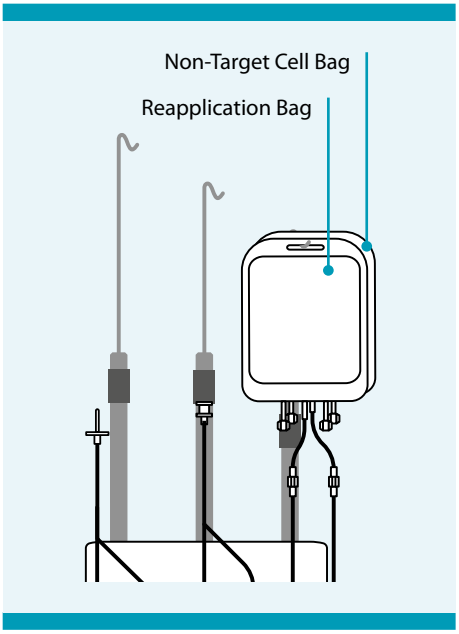
   POZNÁMKA

   Existuje riziko poškodenia prístroja. Preťaženie vešiakov na vaky môže prístroj poškodiť. Nosnosť jedného vešiaka na vaky je 3 kg. Vešiaky na vaky nepreťažujte.
3. Vložte separačný stĺpec do držiaka separačného stĺpca (pozrite si Obrázok 7.14).

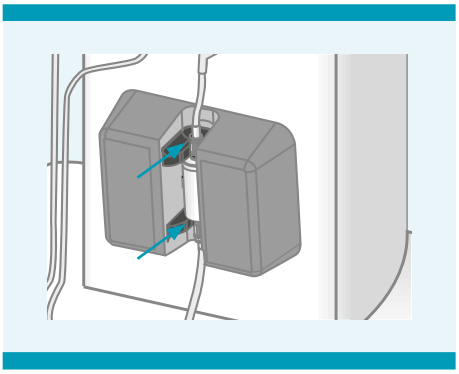
   ⚠ VAROVANIE

   Riziko zranenia. V prípade vloženia alebo vybratia separačného stĺpca pri zapnutej magnetickej jednotke existuje riziko poranenia osôb. Separačný stĺpec vkladajte alebo vyberajte iba vtedy, keď je magnetická jednotka vypnutá.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrázok 7.13: Pripojenie vakov Non-Target Cell Bag a Reapplication Bag



Obrázok 7.14: Separačný stĺpec v držiaku separačného stĺpca

Vloženie hadičiek do ventilov č. 1, 2, 3, 4 a 5

Okno označuje Obrazovka 7.54.

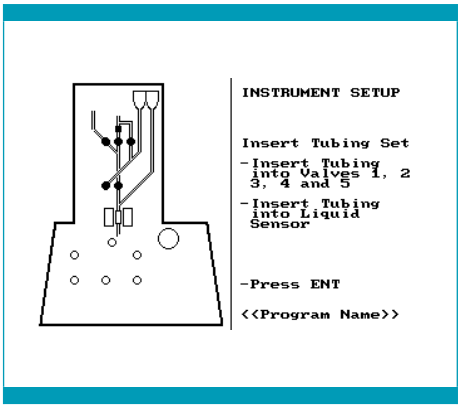
Ventily znázornené na obrazovke sa otvoria automaticky.

1. Vložte hadičky do ventilov č. 1, 2, 3, 4 a 5.
2. Vložte hadičku nad ventilom č. 2 do snímača kvapaliny (pozrite si Obrázok 7.15).

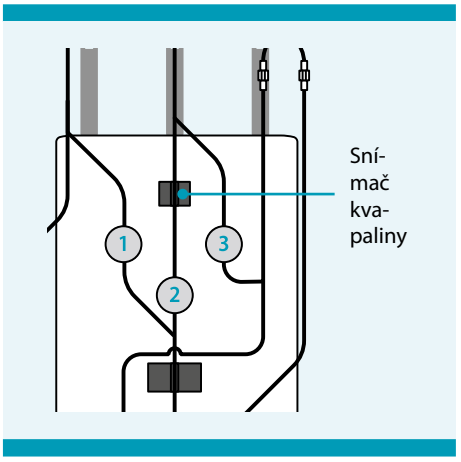
DÔLEŽITÉ

- Snímač kvapaliny aj vkladaná hadička musia byť suché, aby sa zabezpečila správne fungovanie. Dôkladne ich skontrolujte. Ak sa v blízkosti nachádza akákoľvek kvapalina, miesto vysušte mäkkou handričkou nepúšťajúcou vlákna.
- Pri jednotlivých krokoch prekontrolujte všetky hadičky a nadstavce, či nie sú zalomené alebo nadmerne ohnuté, čím by sa mohol obmedziť prietok kvapaliny cez hadičky. Skontrolujte všetky ventily, aby bolo zaistené, že hadičky pevne sedia.
- Súpravu hadičiek vkladajte iba do otvorených ventilov (keď je tlačidlo zatlačené dovnútra). Ak sa hadička vloží do uzavretého ventilu, nezapadne správne.
- Ak je potrebné hadičku upraviť po uzatvorení ventilu, hadičku nevyťahujte bez stlačenia tlačidla ventilu na otvorenie ventilu (pozrite si Obrázok 7.16).

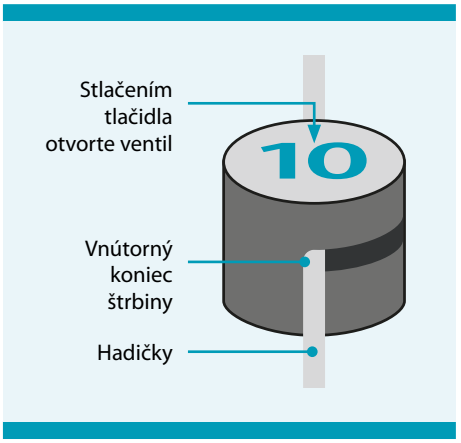
Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrazovka 7.54: Vloženie hadičiek do ventilov č. 1, 2, 3, 4 a 5



Obrázok 7.15: Hadičky vo ventiloch

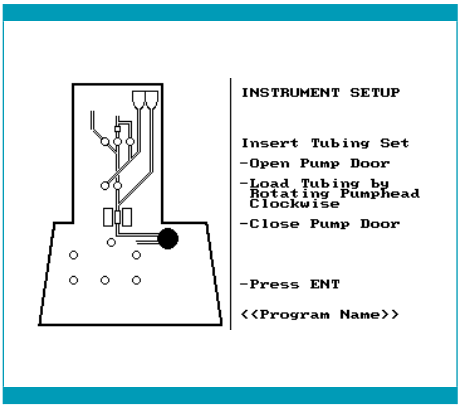


Obrázok 7.16: Správne vložená hadička

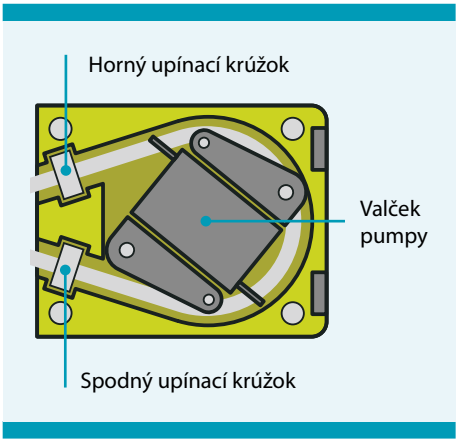
Vloženie hadičky do pumpy

Okno označuje Obrazovka 7.55.

1. Otvorte dvierka pumpy nadvihnutím za ľavý okraj.
2. Vložte horný upínací krúžok na hadičke pumpy do drážky upínacieho krúžku na telese pumpy (pozrite si Obrázok 7.17).
3. Otáčajte valčekom pumpy v smere hodinových ručičiek, až kým sa hadička nezavedie medzi obe súpravy vodiacich kolíkov hadičky a hadička tesne neobopne valček pumpy. Uistite sa, že hadička nie je na konci vodiacich kolíkov stlačená. (Ak je potrebné upraviť hadičku vo vnútri pumpy, hadičku možno odľahčiť zdvihnutím spodného konca a otočením valčeka pumpy proti smeru hodinových ručičiek.)
4. Vložte spodný upínací krúžok na hadičke pumpy do drážky upínacieho krúžku na telese pumpy.
5. Opakujte otáčanie valčeka pumpy v smere hodinových ručičiek, aby ste sa uistili, že sa valček pumpy voľne pohybuje.
6. Zavrite dvierka pumpy.



Obrazovka 7.55: Vloženie hadičky do pumpy



Obrázok 7.17: Vloženie hadičky do pumpy

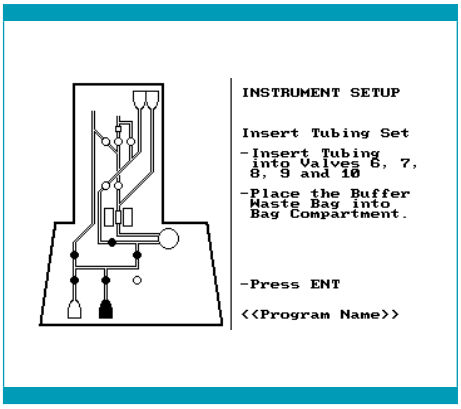
DÔLEŽITÉ

Počas separácie buniek sa pri každom otvorení krytu pumpy okamžite zastaví činnosť pumpy. Ak zostane otvorený dlhšie než 600 sekúnd, prístroj preruší práve prebiehajúcu operáciu.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Vloženie hadičiek do ventilov č. 6, 7, 8, 9 a 10

Okno označuje Obrazovka 7.56.



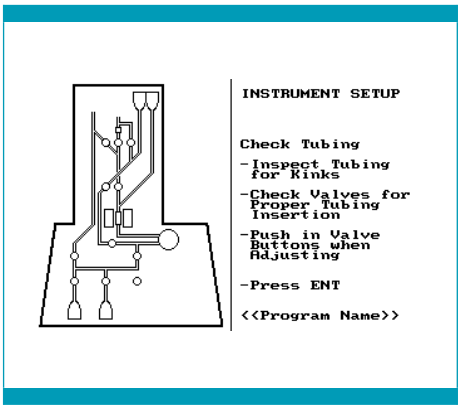
Obrazovka 7.56: Vloženie hadičiek do ventilov č. 6, 7, 8, 9 a 10

1. Vložte hadičky do ventilov č. 6, 7, 8, 9 a 10. Uistite sa, že je hadička bezpečne umiestnená v otvore ventilu.
2. Do priehradky na vaky umiestnite vak Buffer Waste Bag. Uistite sa, že pod vekom priehradky na vaky nie sú hadičky stlačené.
3. Uistite sa, že je možný neobmedzený prietok do vaku Cell Collection Bag.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Opätovná kontrola všetkých hadičiek a nadstavcov

Okno označuje Obrazovka 7.57.



Obrazovka 7.57: Opätovná kontrola všetkých hadičiek a nadstavcov

1. Začnite ventilom č. 1 a overte, či je hadička riadne usadená a správne umiestnená v každom ventile.

   Znova skontrolujte hadičky v jednotlivých ventiloch. Skontrolujte, či hadička vstupuje a vystupuje z každého ventilu cez rozšírenie na vnútornom konci štrbiny (pozrite si Obrázok 7.16).
2. Skontrolujte, či hadička nie je zalomená alebo skrútená.

Poznámka: Ak je potrebné hadičku upraviť po uzatvorení ventilu, hadičku nevyťahujte bez stlačenia tlačidla ventilu na otvorenie ventilu.

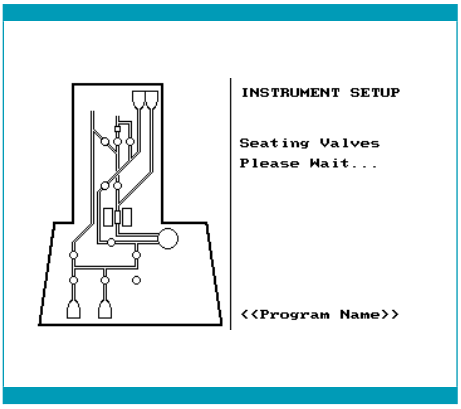
Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Usadenie ventilov

Okno označuje Obrazovka 7.58.

Na zabezpečenie správneho usadenia hadičiek vo ventiloch bude prístroj postupne za sebou ovládať všetky ventily, a to dvakrát. Pozorujte a počúvajte, aby ste sa uistili, že všetky ventily fungujú správne. Ak niektorý z ventilov nefunguje správne, pozrite si kapitolu 8 „Riešenie problémov“ na strane 211. Tento krok je možné zopakovať stlačením ◄ a potom stlačením tlačidla ENT (pozrite si časť „Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

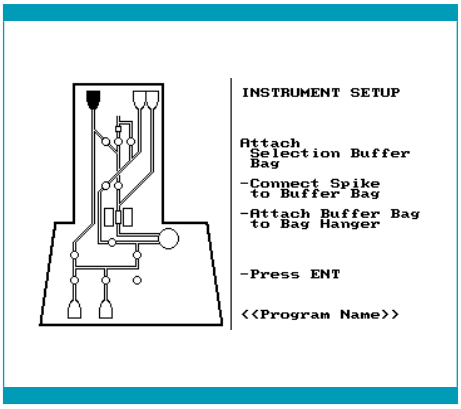
V priebehu tejto kontrolnej sekvencie sa tiež otestuje magnetický pohon.



Obrazovka 7.58: Usadenie ventilov

Pripojenie tlmivého roztoku CliniMACS PBS/EDTA Buffer

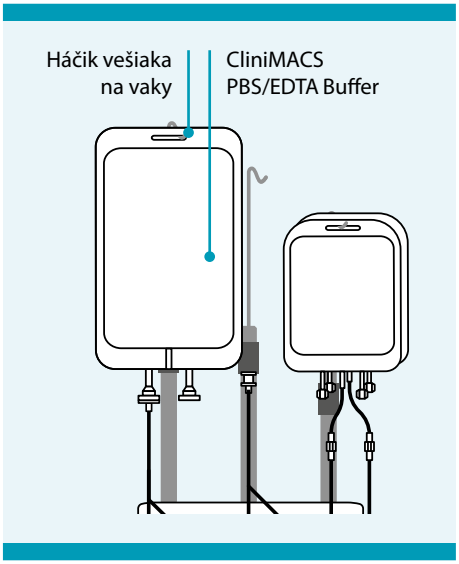
Okno označuje Obrazovka 7.59.



Obrazovka 7.59: Pripojenie vaku na tlmivý roztok

Predpísaným tlmivým roztokom na separácie buniek pomocou systému CliniMACS Plus je tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer doplnený o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.).

1. Použitím aseptických postupov odstráňte uzáver z hrotu pre tlmivý roztok (pozrite si Obrázok 7.12 na strane 176) na súprave hadičiek a pripojte ho k vaku s tlmivým roztokom. Uistite sa, že je membrána prepichnutá, čo umožní voľný prietok kvapaliny. Vak opatrne stlačte, aby ste sa presvedčili, že hrot prenikol do vaku bez úniku smerom von.
2. Pripojte vak s tlmivým roztokom na háčik vešiaka na vaky s tlmivým roztokom (pozrite si Obrázok 7.18).
3. Upravte výšku vešiaka na vaky s tlmivým roztokom. Zdvihnite alebo spusťte vešiak na vaky tak, aby sa jeho výška prispôsobila veľkosti vaku s tlmivým roztokom. Uistite sa, že je dostatočne vysoko, aby sa zabránilo nadmernému ohnutiu hadičky, ktoré by mohlo obmedzovať prietok, a že je zároveň dostatočne nízko, aby nedošlo k natiahnutiu hadičky alebo prípojok.



Obrázok 7.18: Pripojenie vaku na tlmivý roztok

DÔLEŽITÉ

Z dôvodu niekoľkých krokov gravimetrického plnenia a preplachovania je nevyhnutné, aby bol vak na tlmivý roztok umiestnený čo najvyššie a bol vyššie než vaky Reapplication Bag a Non-Target Cell Bag (pozrite si Obrázok 7.20 na strane 188).

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

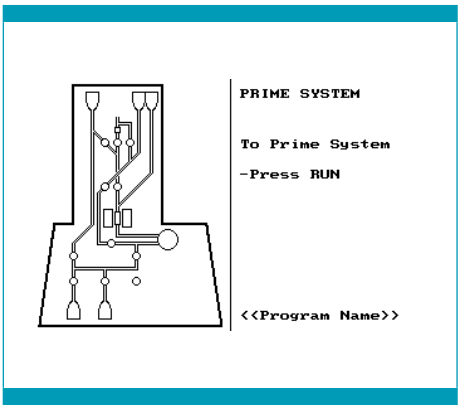
Spustenie plnenia

Okno označuje Obrazovka 7.60.

Na spustenie plnenia stlačte tlačidlo **RUN**.

Okno označuje Obrazovka 7.61.

Počas fázy plnenia sa súprava hadičiek naplní tlmivým roztokom CliniMACS PBS/EDTA Buffer. Tlmivý roztok bude cirkulovať cez súpravu hadičiek vrátane separačného stĺpca. Plniaca kvapalina sa zhromažďuje vo vakoch Buffer Waste Bag, Reapplication Bag a Non-Target Cell Bag, pričom vak Cell Collection Bag zostáva prázdny (pozrite si Obrázok 7.12 na strane 176). Cykly plnenia budú pokračovať a budú sa opakovať série krokov.



Obrazovka 7.60: Spustenie plnenia

Fáza plnenia potrvá približne 2,5 minúty. Stav plnenia sa bude aktualizovať na displeji.

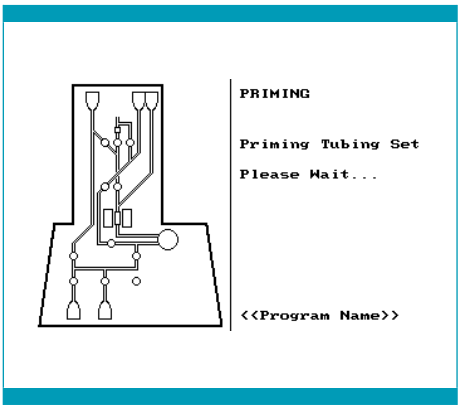
Kontrola počas plnenia

Počas fázy plnenia kontrolujte všetky hadičky, armatúry, ventily a separačný stĺpec, či sa nevyskytujú netesnosti alebo záhyby, ktoré by mohli blokovať prietok kvapaliny.

Ak spozorujete netesnosti alebo poruchy, zastavte prevádzku stlačením tlačidla **STOP**.

Operátor bude mať 600 sekúnd na vyriešenie problému.

Obnovte proces stlačením tlačidla **RUN**.



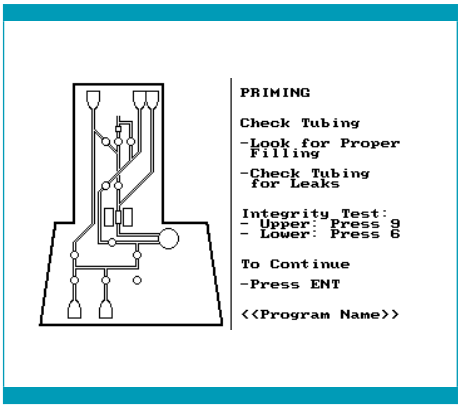
Obrazovka 7.61: Priebeh plnenia

Po 600 sekundách bude separácia zrušená. Ak operátor nedokáže vyriešiť problém alebo ak je súprava hadičiek chybná, súpravu hadičiek vyberte a nahraďte novou.

Poznámka: Po spustení plnenia nie je možný návrat k postupu nastavenia prístroja.

Finálna kontrola všetkých hadičiek a nadstavcov

Okno označuje Obrazovka 7.62.



Obrazovka 7.62: Finálna kontrola hadičiek a nadstavcov

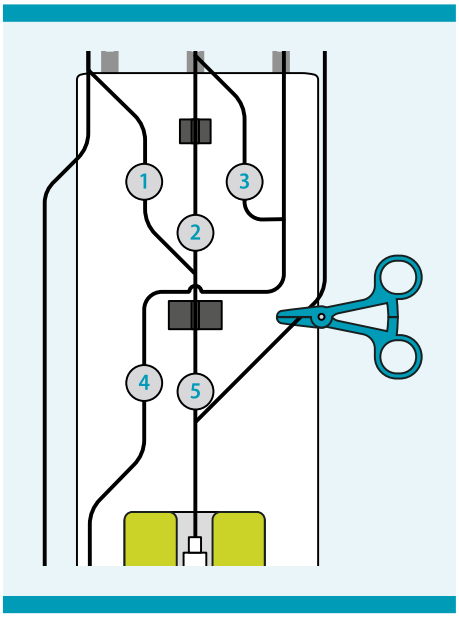
Pred spustením činnosti skontrolujte nasledovné:

- tekutina vo všetkých častiach súpravy hadičiek okrem hadičiek nad ventilmi č. 2 a 3
- žiadny nadbytočný vzduch v súprave hadičiek
- tekutina vo vakoch Reapplication Bag, Buffer Waste Bag a Non-Target Cell Bag
- žiadna tekutina vo vaku Cell Collection Bag

Nestláčajte zatiaľ tlačidlo ENT.

Test integrity

Na zvýšenie bezpečnosti je potrebné vykonať test integrity, aby sa otestovala tesnosť súpravy hadičiek. Testovacia sekvencia sa skladá z dvoch automatických sekvencií, ktoré umožňujú samostatné pretlakovanie a otestovanie hornej aj dolnej časti súpravy hadičiek.



Obrázok 7.19: Príprava na test integrity

⚠ UPOZORNENIE

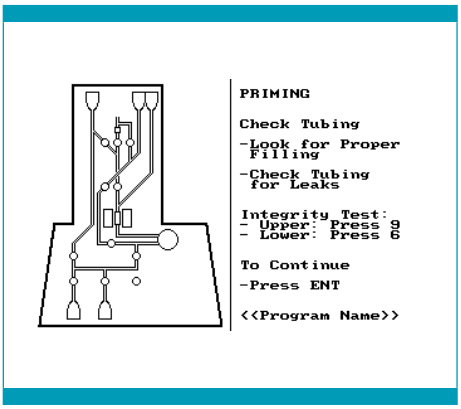
Riziko oneskorenia procesu. Ak nebola svorka pod vakom Non-Target Cell Bag po dokončení testu integrity odstránená, necieľové (označené) bunky nemohli byť počas elúcie zo separačného stĺpca odstránené. Potom nie je možné ďalej zadržiavať necieľové bunky. Postup separácie sa musí zopakovať. Po dokončení testu integrity odstráňte svorku.

DÔLEŽITÉ

Test integrity bude správne fungovať iba vtedy, ak je hadička zasvorkovaná pod vakom Non-Target Cell Bag. Pred začatím testu integrity zasvorkujte hadičku pod vakom Non-Target Cell Bag. Po dokončení testu integrity odstráňte svorku.

Test integrity hornej časti súpravy hadičiek

1. Keď operátor vykonáva postup „finálnej kontroly všetkých hadičiek a nadstavcov“, v okne sa zobrazí Obrazovka 7.63.



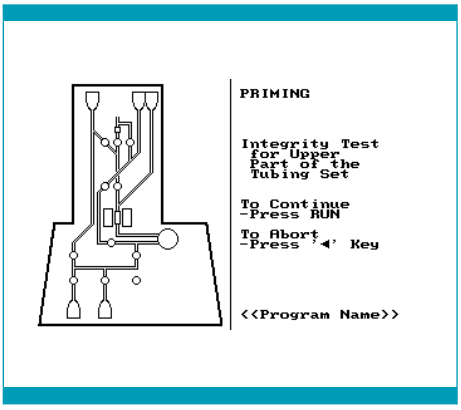
Obrazovka 7.63: Spustenie testu integrity pre hornú časť

2. Po vykonaní postupu „finálnej kontroly všetkých hadičiek a nadstavcov“ **nestlačujte** tlačidlo ENT.

3. Na vstup do testu integrity hornej časti stlačte tlačidlo 9.

   Okno označuje Obrazovka 7.64.

   DÔLEŽITÉ
   Zasvorkujte hadičku pod spätným ventilom vaku Non-Target Cell Bag.



Obrazovka 7.64: Spustenie testu integrity pre hornú časť

4. Na spustenie testovacej sekvencie stlačte tlačidlo RUN.

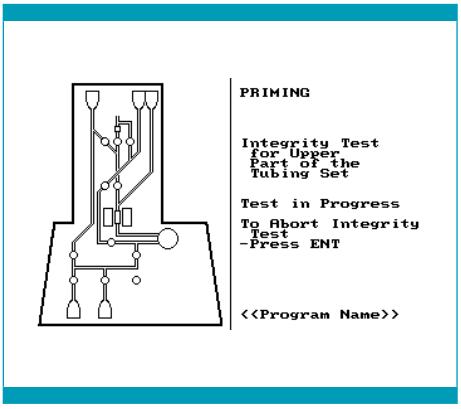
   Na návrat na Obrazovka 7.63 stlačte tlačidlo ◄.

5. Po stlačení tlačidla RUN spustí prístroj automatickú testovaciu sekvenciu pre hornú časť súpravy hadičiek.

   Okno označuje Obrazovka 7.65.

   Vznikne pretlak, ktorý sa bude udržiavať po dobu dvoch minút. Počas tejto doby by operátor mal sledovať všetky pripojenia nad horným pripojením hadičiek pumpy.

   Testovaciu sekvenciu je možné v každom bode ukončiť stlačením tlačidla ENT.



Obrazovka 7.65: Spustenie testu integrity pre hornú časť

6. Po uplynutí dvoch minút sa tlak automaticky uvoľní a v okne sa zobrazí Obrazovka 7.63.

   Skontrolujte, či sa počas testovacej sekvencie neobjavili netesnosti. Ak sa na ktorejkoľvek prípojke súpravy hadičiek objaví netesnosť, súpravu hadičiek je potrebné odstrániť a nahradiť novou.

   Pokyny na vrátenie chybnej súpravy hadičiek získate od technickej podpory Miltenyi Biotec Technical Support.

7. Ak nezaznamenáte žiadne netesnosti, pokračujte testom integrity dolnej časti súpravy hadičiek.

Test integrity dolnej časti súpravy hadičiek

Okno označuje Obrazovka 7.63.

1. Na vstup do testu integrity stlačte tlačidlo 6.
   Nestláčajte tlačidlo ENT.

   Okno označuje Obrazovka 7.66.

2. Na spustenie testovacej sekvencie stlačte tlačidlo RUN.

   Na návrat na Obrazovka 7.63 stlačte tlačidlo ◄.

3. Po stlačení tlačidla RUN spustí prístroj automatickú testovaciu sekvenciu pre dolnú časť súpravy hadičiek.

   Okno označuje Obrazovka 7.67.

   Vznikne pretlak, ktorý sa bude udržiavať po dobu 30 sekúnd.

   Počas tejto doby by operátor mal sledovať dolnú prípojku hadičiek pumpy a armatúry v tvare T medzi ventilmi č. 6, 8, 9 a 10.

   Testovaciu sekvenciu je možné v každom bode ukončiť stlačením tlačidla ENT.

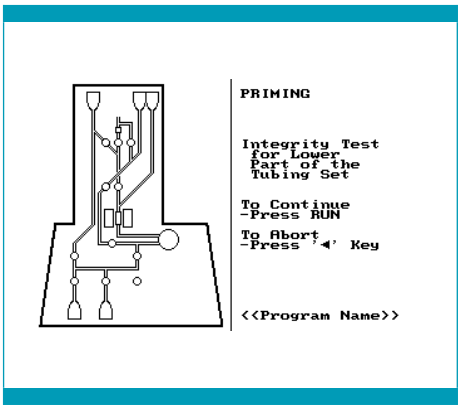
4. Po uplynutí 30 sekúnd sa tlak automaticky uvoľní a v okne sa zobrazí Obrazovka 7.63.

   Operátor musí skontrolovať, či sa počas testovacej sekvencie neobjavili netesnosti. Ak sa na ktorejkoľvek prípojke súpravy hadičiek objaví netesnosť, súpravu hadičiek je potrebné odstrániť a nahradiť novou.

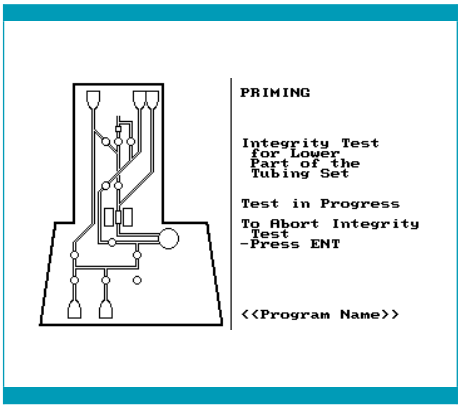
   Pokyny na vrátenie chybnej súpravy hadičiek získate od technickej podpory Miltenyi Biotec Technical Support.

5. **Odstránením svorky pod spätným ventilom otvorte cestu k vaku Non-Target Cell Bag.**

6. Ak operátor nezaznamená žiadne netesnosti, môže pokračovať v nasledujúcom kroku stlačením tlačidla ENT.



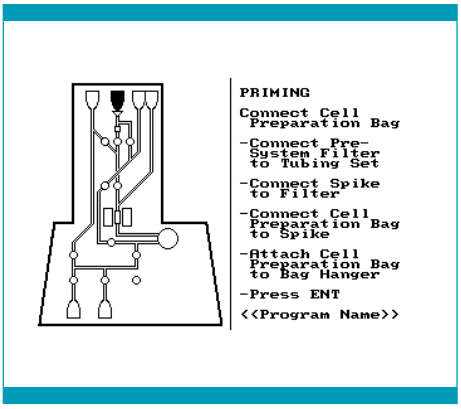
Obrazovka 7.66: Spustenie testu integrity pre dolnú časť



Obrazovka 7.67: Priebeh testu integrity dolnej časti

Pripojenie vaku Cell Preparation Bag

Okno označuje Obrazovka 7.68.



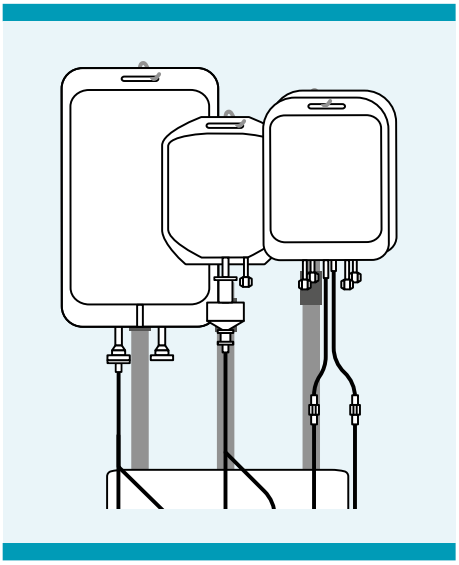
Obrazovka 7.68: Pripojenie vaku Cell Preparation Bag

Pripojte vak Cell Preparation Bag (obsahujúci magneticky označené bunky) k súprave hadičiek:

1. Odstráňte bajonetový uzáver (pozrite si Obrázok 7.12 na strane 176) zo súpravy hadičiek.
2. Odstráňte uzáver z hrotu filtra Pre-System Filter. Pevne zasuňte hrot filtra Pre-System Filter do súpravy hadičiek, pričom sa uistite, že sa prepichne membrána.
3. Odstráňte uzávery z filtra Pre-System Filter a tupý koniec hrotového konektora a obe časti navzájom spojte.
4. Z hrotového konektora odstráňte druhý uzáver a pripojte hrot k vaku Cell Preparation Bag, pričom sa uistite, že došlo k prepichnutiu membrány, aby sa umožnil voľný prietok kvapaliny. Vak opatrne stlačte, aby ste sa presvedčili, že hrot prenikol do vaku.
5. Skontrolujte pripojenie medzi vakom Cell Preparation Bag, hrotovým konektorom, filtrom Pre-System Filter a súpravou hadičiek, aby sa overila bezpečnosť pripojenia.
6. Vak Cell Preparation Bag zaveste na vešiak na vaky (pozrite si Obrázok 7.21).
7. Uistite sa, že vaky a hadičky pripojené k vešiaku na vaky nie sú natiahnuté ani ohnuté.

   Vzhľadom na gravimetrické plnenie a preplachovanie vykonávané počas automatickej separácie je veľmi dôležité, aby boli vaky správne vyrovnané. Na zaistenie úplného spracovania vzorky je tiež mimoriadne dôležité umiestniť vaky Reapplication Bag a Non-Target Cell Bag vyššie než vak Cell Preparation Bag (pozrite si Obrázok 7.20):

   - **Najvyššia poloha:** vak na tlmivý roztok
   - **Stredná poloha:** Vaky Bag Reapplication a Non-Target Cell Bag
   - **Najnižšia poloha:** Cell Preparation Bag



Obrázok 7.20: Správne vyrovnané vaky

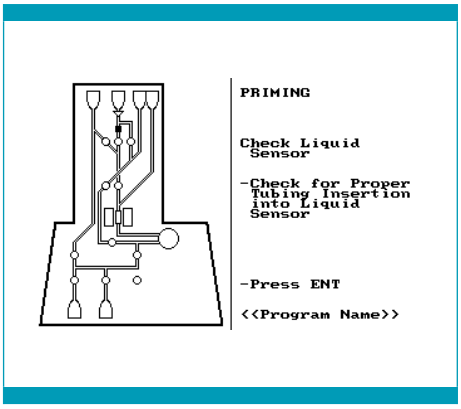
Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Finálna kontrola snímača kvapaliny

Okno označuje Obrazovka 7.69.

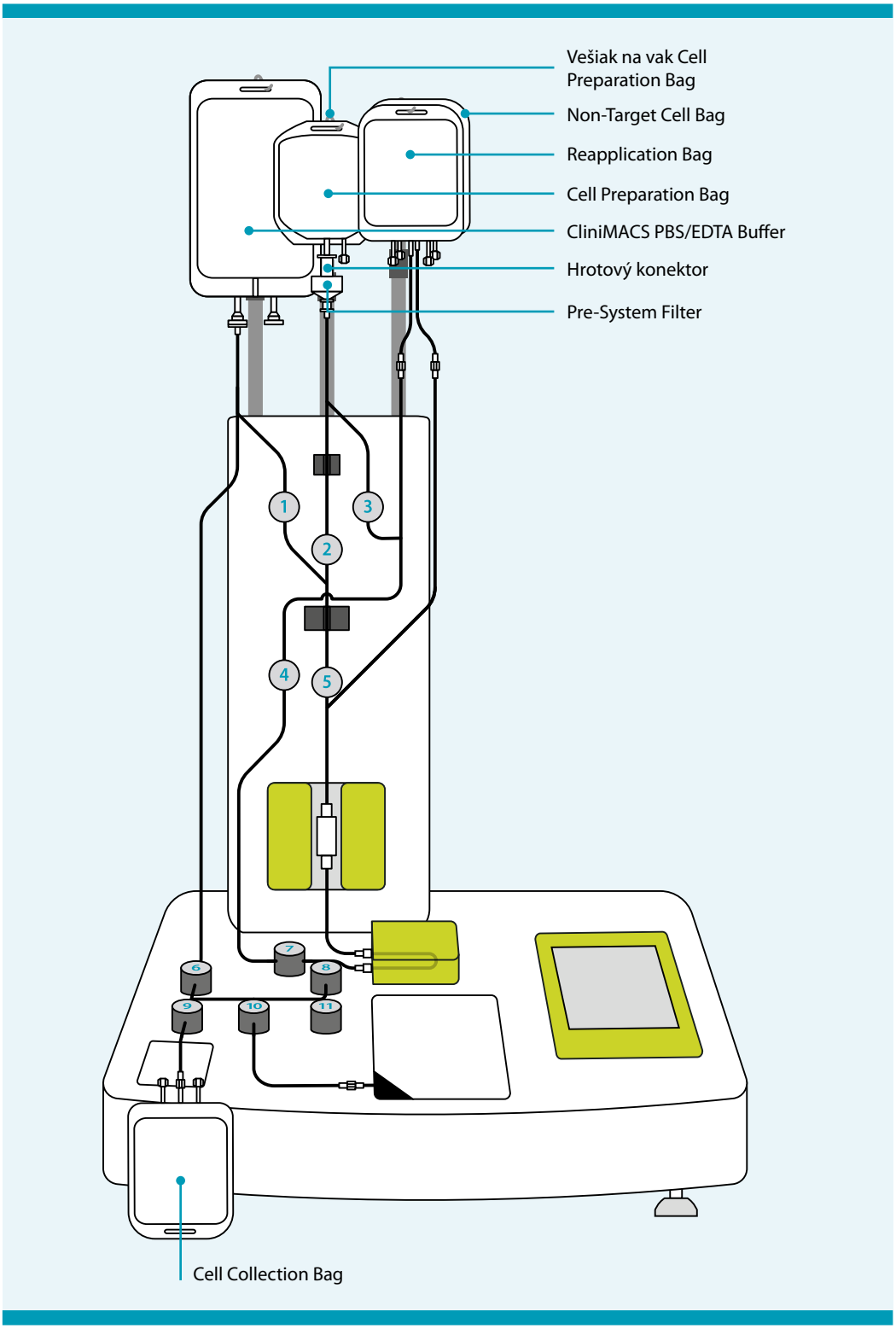
1. Skontrolujte hadičku snímača kvapaliny. Uistite sa, že bola hadička správne vložená, že neobsahuje žiadnu vonkajšiu kvapalinu a že sa počas postupu nakladania nevysunula.
2. Skontrolujte, či je umožnený neobmedzený prietok do každého vaku.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.



Obrazovka 7.69: Finálna kontrola snímača kvapaliny

▶ **Prejdite na KROK 4.**



Obrázok 7.21: Prístroj CliniMACS Plus Instrument so súpravou hadičiek CliniMACS Depletion Tubing Set, činidlom CliniMACS PBS/EDTA Buffer, vakom Cell Preparation Bag a vakom Cell Collection Bag

7.4 KROK 4: Separácia buniek pomocou systému CliniMACS Plus

7.4.1 CD34 SELECTION 1/2

Po dokončení finálnej kontroly je prístroj CliniMACS Plus Instrument pripravený začať separáciu. Okno označuje Obrazovka 7.70.

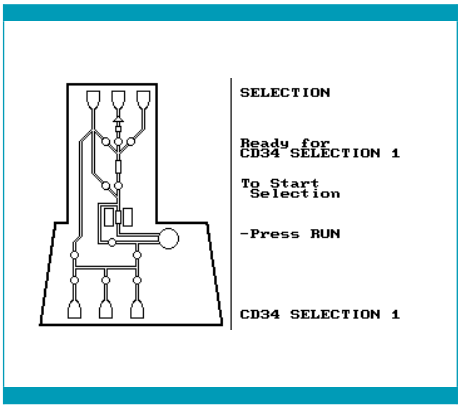
Pokračujte stlačením tlačidla **RUN**.

Po stlačení tlačidla **RUN** prístroj automaticky vykoná zvolený postup separácie.

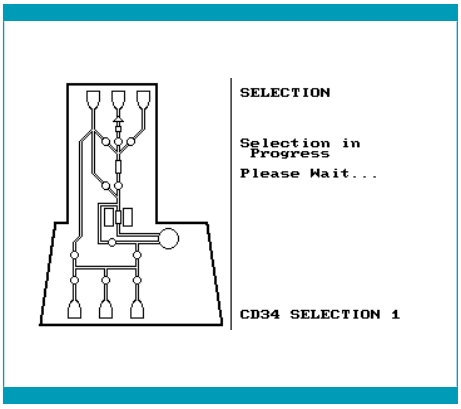
V každej fáze operácie sa zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.71, ktorá indikuje stav postupu separácie.

Indikátor polohy magnetu sa zobrazuje ako dve čierne políčka vedľa separačného stĺpca, keď je magnet „ON“ (zapnutý), t. j. bol posunutý dopredu, aby zmagnetizoval separačný stĺpec. Ak je indikátor polohy magnetu priehľadný (napr. Obrazovka 7.70), magnet je „OFF“ (vypnutý), t. j. bol posunutý do zadnej časti prístroja. Keď sa magnet vytiahne, separačný stĺpec je mimo magnetického poľa a nie je už zmagnetizovaný.

Poznámka: Na obrazovke sa môže zobrazovať iný názov programu v závislosti od zvoleného separačného programu (CD34 SELECTION 1 alebo 2).



Obrazovka 7.70: Spustenie separácie



Obrazovka 7.71: Priebeh separácie

Postup separácie

Nakladanie buniek

Postup separácie začína naplnením filtra Pre-System Filter, aby sa odstránil zvyšný vzduch z filtra Pre-System Filter.

Následne začne separácia označených buniek. Pumpa nasaje obsah vaku Cell Preparation Bag do súpravy hadičiek a zavedie bunkový produkt cez predradený stĺpec na separačný stĺpec. Magneticky označené bunky (cieľové bunky) sa zadržiavajú v separačnom stĺpci umiestnenom v magnetickom poli, kým neoznačené bunky (necieľové bunky) prechádzajú cezeň a zhromažďujú sa vo vaku Negative Fraction Bag. Keď je vak Cell Preparation Bag prázdny (čo automaticky deteguje snímač kvapaliny), filter Pre-System Filter sa dvakrát premyje tlmivým roztokom.

Premývanie stĺpca I

Predradený stĺpec a separačný stĺpec sa dôkladne premyjú, aby sa odstránili všetky neoznačené bunky. Premývací tlmivý roztok sa zhromažďuje vo vaku Buffer Waste Bag. Keď sa spustí fáza „Premývanie stĺpca I“, zobrazí sa celkový čas zostávajúci do konca postupu separácie.

DÔLEŽITÉ

Na začiatku separácie sa tlmivý roztok pumpuje smerom nahor k vaku Cell Preparation Bag, aby sa naplnil filter Pre-System Filter. Poklepaním niekoľkokrát jemne na bok filtra odstráňte všetky prípadné bubliny, ktoré sa mohli zachytiť vo filtri.

Uvoľnenie buniek I

Magnet sa presunie do zadnej časti prístroja (poloha „OFF“ (vypnuté)). Zadržané bunky sa uvoľnia s vysokou rýchlosťou prietoku, ale bunky zostanú v cykle vnútorných hadičiek.

Opätovné naloženie buniek I

Magnet sa znova presunie do polohy „ON“ (zapnuté), aby sa zmagnetizoval separačný stĺpec a bunky sa opäť nanesú na separačný stĺpec.

Premývanie stĺpca II

Po opätovnom naložení buniek nasleduje druhý premývací krok na odstránenie zvyšných neoznačených buniek. Niekoľkokrát sa tiež prepláchnu všetky hadičky.

Uvoľnenie buniek II, opätovné naloženie buniek II, premývanie stĺpca III

Bunky sa uvoľnia a znova nanesú na separačný stĺpec po druhý raz, aby sa odstránili všetky neoznačené bunky, ktoré nešpecificky priľnuli k matrici stĺpca. Potom sa separačný stĺpec opäť premyje.

Uvoľnenie buniek III, opätovné naloženie buniek III, premývanie stĺpca IV

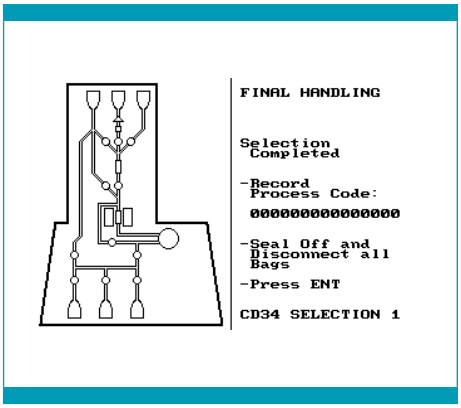
Separačný program CD34 SELECTION 2 ďalej zahŕňa tretí krok uvoľnenia a opätovnej aplikácie.

Finálna elúcia buniek

Magnet sa presunie do polohy „OFF“ (vypnuté) a magneticky označené bunky sa uvoľnia zo separačného stĺpca a zhromaždia sa v pripojenom vaku Cell Collection Bag.

Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

Po skončení činnosti sa v okne zobrazí Obrazovka 7.72.

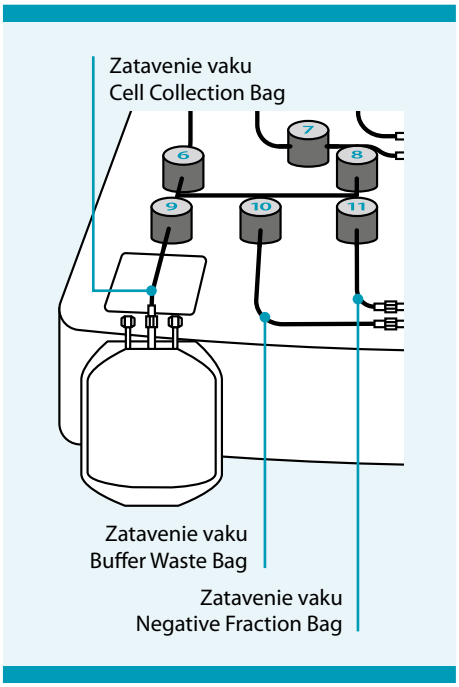


Obrazovka 7.72: Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

1. Zaznamenajte kód procesu.
2. Zasvorkujte alebo zatavte hadičky nad prípojkou luer lock pripájajúcou vak Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Obrázok 7.22).

   V hadičke priamo pod ventilom č. 9 urobte tri hermetické zatavenia. Opatrne oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Cell Collection Bag od súpravy hadičiek.
3. Odvážte naplnený vak Cell Collection Bag. Zaznamenajte hmotnosť.

   Stanovte hmotnosť frakcie cieľových buniek odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujúceho cieľové bunky. Zaznamenajte hmotnosť.
4. Otáčaním vaku dôkladne premiešajte suspenziu cieľových buniek. Odoberte primerané množstvo, napr. 0,5 mL, a uchovajte na analýzu.
5. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičku nad prípojkou luer lock vaku Negative Fraction Bag. V hadičke urobte tri hermetické zatavenia. Oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Negative Fraction Bag.
6. Rovnakým spôsobom odpojte vak Buffer Waste Bag.
7. Odstráňte vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Všetky vaky si uchovajte, kým sa nedokončí finálna analýza všetkých buniek.



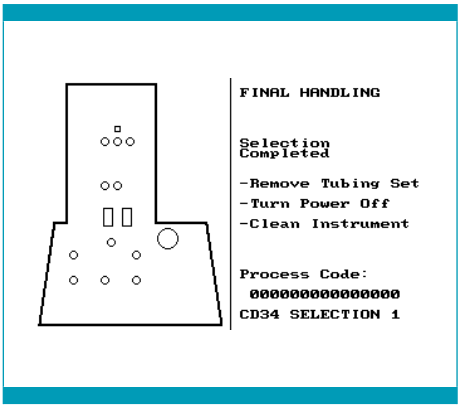
Obrázok 7.22: Odpojenie vakov

Cieľové bunky je teraz možné spracovať v súlade s klinickými protokolmi.

Pokračujte stlačením tlačidla **RUN**.

Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

Okno označuje Obrazovka 7.73.



Obrazovka 7.73: Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

1. Odstráňte súpravu hadičiek: Začnite ventilmi č. 6, 9, 10 a 11 a postupovaním smerom nahor postupne uvoľnite hadičky zo snímača kvapaliny a z ventilov zatlačením na ventily. Uvoľnite stĺpce z držiakov stĺpcov. Súpravu hadičiek zlikvidujte ako biologicky nebezpečný odpad v súlade so štandardnými nemocničnými postupmi.
2. Vypnite prístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistite prístroj podľa odporúčaných pokynov na čistenie – pozrite si časť „Čistenie a dezinfekcia“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument. Postupujte podľa štandardných postupov na zaobchádzanie s infekčnými materiálmi.

Analýza buniek

DÔLEŽITÉ

- Tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie je potrebné pred podaním separovaných cieľových buniek odstraňovať, ak objem neprekročí 100 mL na transplantát pri vhodných rýchlostiach infúzie. Je potrebné zohľadniť stav obličiek pacienta a účinky na elektrolyty v krvi. Predovšetkým u detí je potrebné primerane upraviť rýchlosť infúzie.
- Ak objem frakcie cieľových buniek prekročí 100 mL, je potrebné ho vhodným spôsobom znížiť, napr. odstreďovaním alebo výmenou tlmivého roztoku, na infúzny roztok schválený v krajine používateľa.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko zníženia kvality cieľových buniek. Cieľové bunky musia byť analyzované a musí sa overiť, že spĺňajú používateľské požiadavky, inak môže byť narušená vhodnosť na klinické použitie. Preskúmajte cieľové bunky z hľadiska kvality a kvantity vzhľadom na ich plánované použitie.

Musí to zahŕňať nasledujúce parametre:

- celkový počet leukocytov,
- životaschopnosť a celkový počet cieľových buniek,
- čistota a výťažnosť cieľových buniek.

Taktiež sa odporúča stanoviť celkový počet leukocytov a životaschopnosť frakcie necieľových buniek. Tento zoznam je iba príkladom a na základe plánovaného použitia a klinických protokolov je potrebné zahrnúť aj ďalšie testy. Zaznamenajte údaje z analýzy.

7.4.2 ENRICHMENT 1.1

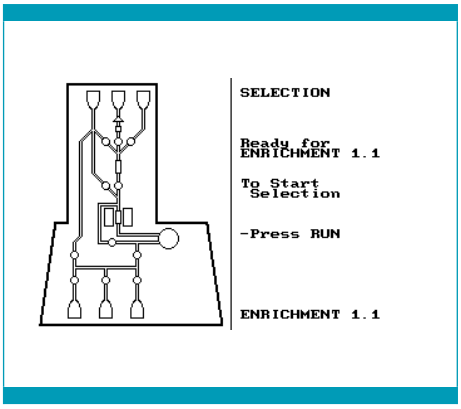
Po dokončení finálnej kontroly je prístroj CliniMACS Plus Instrument pripravený začať separáciu. Okno označuje Obrazovka 7.74.

Pokračujte stlačením tlačidla **RUN**.

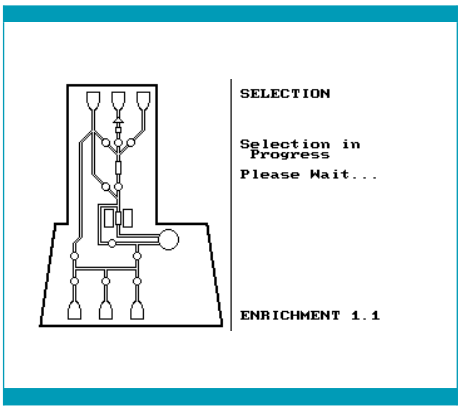
Po stlačení tlačidla **RUN** prístroj automaticky vykoná zvolený postup separácie.

V každej fáze operácie sa zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.75, ktorá indikuje stav postupu separácie.

Indikátor polohy magnetu sa zobrazuje ako dve čierne políčka vedľa separačného stĺpca, keď je magnet „ON“ (zapnutý), t. j. bol posunutý dopredu, aby zmagnetizoval separačný stĺpec. Ak je indikátor polohy magnetu priehľadný (napr. Obrazovka 7.74), magnet je „OFF“ (vypnutý), t. j. bol posunutý do zadnej časti prístroja. Keď sa magnet vytiahne, separačný stĺpec je mimo magnetického poľa a nie je zmagnetizovaný.



Obrazovka 7.74: Spustenie separácie



Obrazovka 7.75: Priebeh separácie

Postup separácie

Nakladanie buniek

Postup separácie začína naplnením filtra Pre-System Filter, aby sa odstránil zvyšný vzduch z filtra Pre-System Filter. Následne začne separácia označených buniek. Pumpa nasaje obsah vaku Cell Preparation Bag do súpravy hadičiek a zavedie bunkový produkt cez predradený stĺpec na separačný stĺpec. Magneticky označené bunky (cieľové bunky) sa zadržiavajú v separačnom stĺpci umiestnenom v magnetickom poli, kým neoznačené bunky (necieľové bunky) prechádzajú cezeň a zhromažďujú sa vo vaku Negative Fraction Bag.

DÔLEŽITÉ

Na začiatku separácie sa tlmivý roztok pumpuje smerom nahor k vaku Cell Preparation Bag, aby sa naplnil filter Pre-System Filter. Poklepaním niekoľkokrát jemne na bok filtra odstráňte všetky prípadné bubliny, ktoré sa mohli zachytiť vo filtri.

Poznámka:

- Ak počet magneticky označených buniek (vypočítaný softvérom CliniMACS Plus) prekročí väzobnú kapacitu separačného stĺpca, separačný program automaticky naplní a separuje vzorku buniek na vhodné časti („postupné nakladanie“).
- Nakladanie sa zastaví, keď sa dosiahne kapacita separačného stĺpca a separačný program prejde k nasledujúcemu kroku separácie. Po dokončení posledného kroku (finálna elúcia buniek) sa na stĺpec naloží ďalšia časť vzorky a zodpovedajúcim spôsobom sa spracuje.

Premývanie stĺpca I

Predradený stĺpec a separačný stĺpec sa dôkladne premyjú, aby sa odstránili všetky neoznačené bunky. Premývací tlmivý roztok sa zhromažďuje vo vaku Buffer Waste Bag.

Uvoľnenie buniek

Magnet sa presunie do zadnej časti prístroja (poloha „OFF“ (vypnuté)). Zadržané bunky sa uvoľnia s vysokou rýchlosťou prietoku, ale zostanú v cykle vnútorných hadičiek.

Opätovné naloženie buniek

Magnet sa znova presunie do polohy „ON“ (zapnuté), aby sa zmagnetizoval separačný stĺpec a bunky sa opäť nanesú na separačný stĺpec.

Premývanie stĺpca II

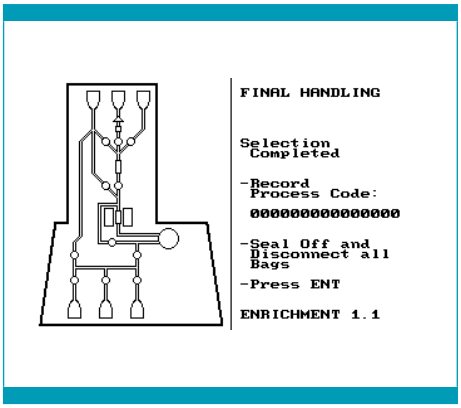
Po opätovnom naložení buniek nasleduje druhá sekvencia premývania stĺpca na odstránenie zvyšných neoznačených buniek. Niekoľkokrát sa tiež prepláchnu všetky hadičky.

Finálna elúcia buniek

Magnet sa presunie do polohy „OFF“ (vypnuté) a magneticky označené bunky (cieľové bunky) sa uvoľnia zo separačného stĺpca a zhromaždia sa vo vaku Cell Collection Bag.

Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

Po skončení činnosti sa v okne zobrazí Obrazovka 7.76.

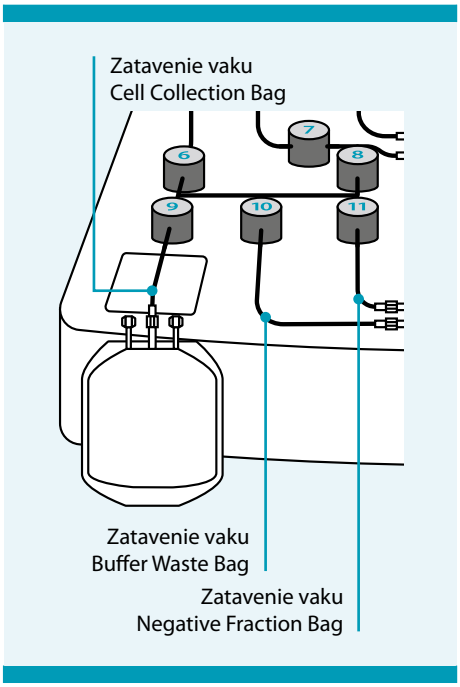


Obrazovka 7.76: Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

1. Zaznamenajte kód procesu.
2. Zasvorkujte alebo zatavte hadičky nad prípojkou luer lock pripájajúcou vak Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Obrázok 7.23).

   V hadičke priamo pod ventilom č. 9 urobte tri hermetické zatavenia. Opatrne oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Cell Collection Bag od súpravy hadičiek.
3. Odvážte naplnený vak Cell Collection Bag. Zaznamenajte hmotnosť.

   Stanovte hmotnosť frakcie cieľových buniek odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujúceho cieľové bunky. Zaznamenajte hmotnosť.
4. Otáčaním vaku dôkladne premiešajte suspenziu cieľových buniek. Odoberte primerané množstvo, napr. 0,5 mL, a uchovajte na analýzu.
5. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičku nad prípojkou luer lock vaku Negative Fraction Bag. V hadičke urobte tri hermetické zatavenia. Oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Negative Fraction Bag.
6. Rovnakým spôsobom odpojte vak Buffer Waste Bag.
7. Odstráňte vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Všetky vaky si uchovajte, kým sa nedokončí finálna analýza všetkých buniek.



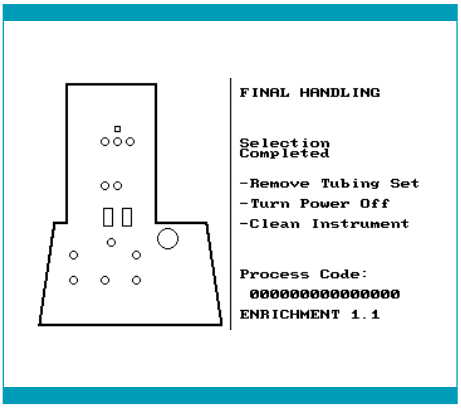
Obrázok 7.23: Odpojenie vakov

Cieľové bunky je teraz možné spracovať v súlade s klinickými protokolmi.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

Okno označuje Obrazovka 7.77.



Obrazovka 7.77: Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

1. Odstráňte súpravu hadičiek: Začnite ventilmi č. 6, 9, 10 a 11 a postupovaním smerom nahor postupne uvoľnite hadičky zo snímača kvapaliny a z ventilov zatlačením na ventily. Uvoľnite stĺpce z držiakov stĺpcov. Súpravu hadičiek zlikvidujte ako biologicky nebezpečný odpad v súlade so štandardnými nemocničnými postupmi.
2. Vypnite prístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistite prístroj podľa odporúčaných pokynov na čistenie – pozrite si časť „Čistenie a dezinfekcia“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument. Postupujte podľa štandardných postupov na zaobchádzanie s infekčnými materiálmi.

Analýza buniek

DÔLEŽITÉ

- Tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie je potrebné pred podaním separovaných cieľových buniek odstraňovať, ak objem neprekročí 100 mL na transplantát pri vhodných rýchlostiach infúzie. Je potrebné zohľadniť stav obličiek pacienta a účinky na elektrolyty v krvi. Predovšetkým u detí je potrebné primerane upraviť rýchlosť infúzie.
- Ak objem frakcie cieľových buniek prekročí 100 mL, je potrebné ho vhodným spôsobom znížiť, napr. odstreďovaním alebo výmenou tlmivého roztoku, na infúzny roztok schválený v krajine používateľa.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko zníženia kvality cieľových buniek. Cieľové bunky musia byť analyzované a musí sa overiť, že spĺňajú používateľské požiadavky, inak môže byť narušená vhodnosť na klinické použitie. Preskúmajte cieľové bunky z hľadiska kvality a kvantity vzhľadom na ich plánované použitie.

Musí to zahŕňať nasledujúce parametre:

- celkový počet leukocytov,
- životaschopnosť a celkový počet cieľových buniek,
- čistota (účinnosť ochudobňovania) a výťažnosť cieľových buniek.

Taktiež sa odporúča stanoviť celkový počet leukocytov a životaschopnosť frakcie necieľových buniek. Tento zoznam je iba príkladom a na základe plánovaného použitia a klinických protokolov je potrebné zahrnúť aj ďalšie testy. Zaznamenajte údaje z analýzy.

7.4.3 ENRICHMENT 3.2

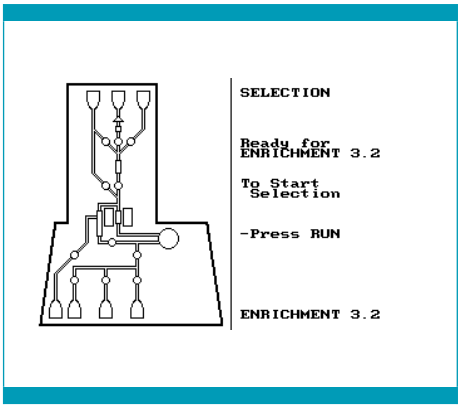
Po dokončení finálnej kontroly je prístroj CliniMACS Plus Instrument pripravený začať separáciu. Okno označuje Obrazovka 7.78.

Pokračujte stlačením tlačidla **RUN**.

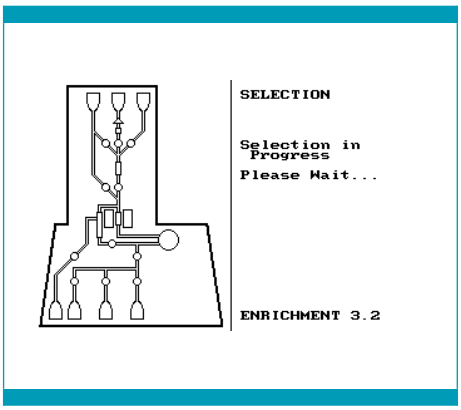
Po stlačení tlačidla **RUN** prístroj automaticky vykoná zvolený postup separácie.

V každej fáze operácie sa zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.79, ktorá indikuje stav postupu separácie.

Indikátor polohy magnetu sa zobrazuje ako dve čierne políčka vedľa separačného stĺpca, keď je magnet „ON“ (zapnutý), t. j. bol posunutý dopredu, aby zmagnetizoval separačný stĺpec. Ak je indikátor polohy magnetu priehľadný (napr. Obrazovka 7.78), magnet je „OFF“ (vypnutý), t. j. bol posunutý do zadnej časti prístroja. Keď sa magnet vytiahne, separačný stĺpec je mimo magnetického poľa a nie je zmagnetizovaný.



Obrazovka 7.78: Spustenie separácie



Obrazovka 7.79: Priebeh separácie

Postup separácie

Nakladanie buniek

Postup separácie začína naplnením filtra Pre-System Filter, aby sa odstránil zvyšný vzduch z filtra Pre-System Filter. Následne začne separácia označených buniek. Pumpa nasaje obsah vaku Cell Preparation Bag do súpravy hadičiek a zavedie bunkový produkt cez predradený stĺpec na separačný stĺpec. Magneticky označené bunky (cieľové bunky) sa zadržiavajú v separačnom stĺpci umiestnenom v magnetickom poli, kým neoznačené bunky (necieľové bunky) prechádzajú cezeň a zhromažďujú sa vo vaku Negative Fraction Bag. Keď je vak Cell Preparation Bag prázdny (čo automaticky deteguje snímač kvapaliny), filter Pre-System Filter sa dvakrát premyje tlmivým roztokom.

DÔLEŽITÉ

Na začiatku separácie sa tlmivý roztok pumpuje smerom nahor k vaku Cell Preparation Bag, aby sa naplnil filter Pre-System Filter. Poklepaním niekoľkokrát jemne na bok filtra odstráňte všetky prípadné bubliny, ktoré sa mohli zachytiť vo filtri.

Premývanie stĺpca I

Predradený stĺpec a separačný stĺpec sa dôkladne premyjú, aby sa odstránili všetky neoznačené bunky. Premývací tlmivý roztok sa zhromažďuje vo vaku Buffer Waste Bag.

Uvoľnenie buniek I

Magnet sa presunie do zadnej časti prístroja (poloha „OFF“ (vypnuté)). Zadržané bunky sa uvoľnia s vysokou rýchlosťou prietoku, ale bunky zostanú v cykle vnútorných hadičiek.

Opätovné naloženie buniek I

Magnet sa znova presunie do polohy „ON“ (zapnuté), aby sa zmagnetizoval separačný stĺpec a bunky sa opäť nanesú na separačný stĺpec.

Premývanie stĺpca II

Po opätovnom naložení buniek nasleduje druhý premývací krok na odstránenie zvyšných neoznačených buniek. Niekoľkokrát sa tiež prepláchnu všetky hadičky.

Uvoľnenie buniek II, opätovné naloženie buniek II, premývanie stĺpca III

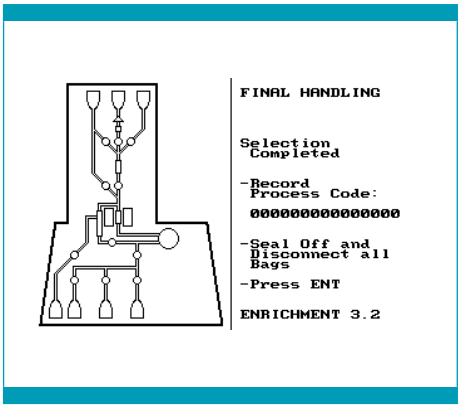
Bunky sa uvoľnia a znova nanesú na separačný stĺpec po druhý raz, aby sa odstránili všetky neoznačené bunky, ktoré nešpecificky priľnuli k matrici stĺpca. Potom sa separačný stĺpec opäť premyje.

Finálna elúcia buniek

Magnet sa presunie do polohy „OFF“ (vypnuté) a magneticky označené bunky (cieľové bunky) sa uvoľnia a zhromaždia vo vaku Cell Collection Bag.

Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

Po skončení činnosti sa v okne zobrazí Obrazovka 7.80.

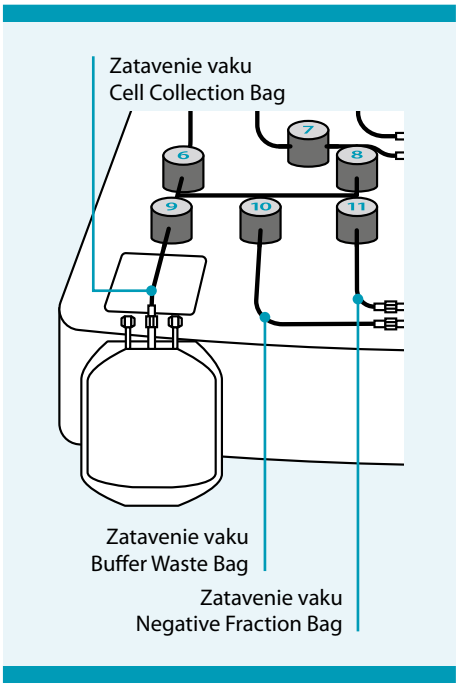


Obrazovka 7.80: Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

1. Zaznamenajte kód procesu.
2. Zasvorkujte alebo zatavte hadičky nad prípojkou luer lock pripájajúcou vak Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Obrázok 7.24).

   V hadičke priamo pod ventilom č. 9 urobte tri hermetické zatavenia. Opatrne oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Cell Collection Bag od súpravy hadičiek.
3. Odvážte naplnený vak Cell Collection Bag. Zaznamenajte hmotnosť.

   Stanovte hmotnosť frakcie cieľových buniek odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujúceho cieľové bunky. Zaznamenajte hmotnosť.
4. Otáčaním vaku dôkladne premiešajte suspenziu cieľových buniek. Odoberte primerané množstvo, napr. 0,5 mL, a uchovajte na analýzu.
5. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičku nad prípojkou luer lock vaku Negative Fraction Bag. V hadičke urobte tri hermetické zatavenia. Oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Negative Fraction Bag.
6. Rovnakým spôsobom odpojte vak Buffer Waste Bag.
7. Odstráňte vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Všetky vaky si uchovajte, kým sa nedokončí finálna analýza všetkých buniek.



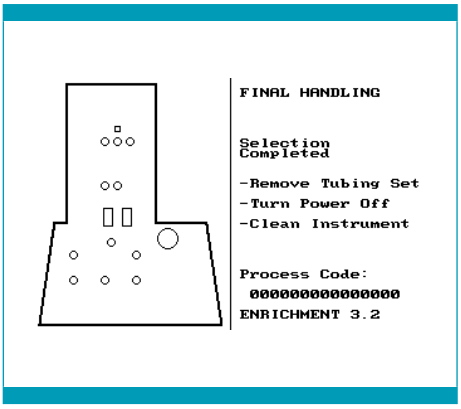
Obrázok 7.24: Odpojenie vakov

Cieľové bunky je teraz možné spracovať v súlade s klinickými protokolmi.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

Okno označuje Obrazovka 7.81.



Obrazovka 7.81: Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

1. Odstráňte súpravu hadičiek: Začnite ventilmi č. 6, 9, 10 a 11 a postupovaním smerom nahor postupne uvoľnite hadičky zo snímača kvapaliny a z ventilov zatlačením na ventily. Uvoľnite stĺpce z držiakov stĺpcov. Súpravu hadičiek zlikvidujte ako biologicky nebezpečný odpad v súlade so štandardnými nemocničnými postupmi.
2. Vypnite prístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistite prístroj podľa odporúčaných pokynov na čistenie – pozrite si časť „Čistenie a dezinfekcia“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument. Postupujte podľa štandardných postupov na zaobchádzanie s infekčnými materiálmi.

Analýza buniek

DÔLEŽITÉ

- Tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie je potrebné pred podaním separovaných cieľových buniek odstraňovať, ak objem neprekročí 100 mL na transplantát pri vhodných rýchlostiach infúzie. Je potrebné zohľadniť stav obličiek pacienta a účinky na elektrolyty v krvi. Predovšetkým u detí je potrebné primerane upraviť rýchlosť infúzie.
- Ak objem frakcie cieľových buniek prekročí 100 mL, je potrebné ho vhodným spôsobom znížiť, napr. odstreďovaním alebo výmenou tlmivého roztoku, na infúzny roztok schválený v krajine používateľa.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko zníženia kvality cieľových buniek. Cieľové bunky musia byť analyzované a musí sa overiť, že spĺňajú používateľské požiadavky, inak môže byť narušená vhodnosť na klinické použitie. Preskúmajte cieľové bunky z hľadiska kvality a kvantity vzhľadom na ich plánované použitie.

Musí to zahŕňať nasledujúce parametre:

- celkový počet leukocytov,
- životaschopnosť a celkový počet cieľových buniek,
- čistota a výťažnosť cieľových buniek.

Taktiež sa odporúča stanoviť celkový počet leukocytov a životaschopnosť frakcie necieľových buniek. Tento zoznam je iba príkladom a na základe plánovaného použitia a klinických protokolov je potrebné zahrnúť aj ďalšie testy. Zaznamenajte údaje z analýzy.

7.4.4 DEPLETION 2.1

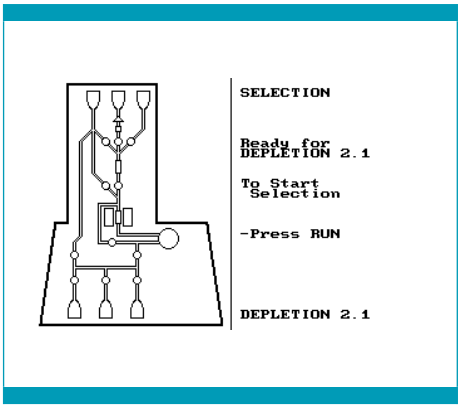
Po dokončení finálnej kontroly je prístroj CliniMACS Plus Instrument pripravený začať separáciu. Okno označuje Obrazovka 7.82.

Pokračujte stlačením tlačidla **RUN**.

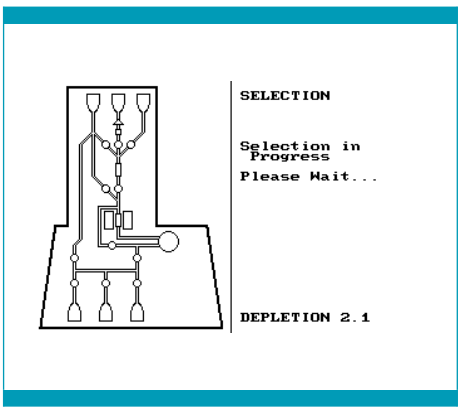
Po stlačení tlačidla **RUN** prístroj automaticky vykoná zvolený postup separácie.

V každej fáze operácie sa zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.83, ktorá indikuje stav postupu separácie.

Indikátor polohy magnetu sa zobrazuje ako dve čierne políčka vedľa separačného stĺpca, keď je magnet „ON“ (zapnutý), t. j. bol posunutý dopredu, aby zmagnetizoval separačný stĺpec. Ak je indikátor polohy magnetu priehľadný (napr. Obrazovka 7.82), magnet je „OFF“ (vypnutý), t. j. bol posunutý do zadnej časti prístroja. Keď sa magnet vytiahne, separačný stĺpec je mimo magnetického poľa a nie je zmagnetizovaný.



Obrazovka 7.82: Spustenie separácie



Obrazovka 7.83: Priebeh separácie

Postup separácie

Nakladanie buniek

Postup separácie začína naplnením filtra Pre-System Filter, aby sa dokončilo naplnenie systému. Následne začne separácia označených buniek. Pumpa nasaje obsah vaku Cell Preparation Bag do súpravy hadičiek. Magneticky označené bunky (necieľové bunky) sa zadržiavajú v separačnom stĺpci umiestnenom v magnetickom poli, kým neoznačené bunky (cieľové bunky) prechádzajú cezeň a zhromažďujú sa vo vaku Cell Collection Bag.

DÔLEŽITÉ

Na začiatku separácie sa tlmivý roztok pumpuje smerom nahor k vaku Cell Preparation Bag, aby sa naplnil filter Pre-System Filter. Poklepaním niekoľkokrát jemne na bok filtra odstráňte všetky prípadné bubliny, ktoré sa mohli zachytiť vo filtri.

Preplachovanie filtra Pre-System Filter

Po tom, ako sa vzorka buniek úplne naloží do súpravy hadičiek, filter Pre-System Filter sa dvakrát prepláchne tlmivým roztokom, aby sa znížila strata buniek vo filtri.

Poznámka:

- Ak počet magneticky označených buniek (vypočítaný softvérom CliniMACS Plus) prekročí väzobnú kapacitu separačného stĺpca, separačný program automaticky naloží a separuje vzorku buniek na menšie časti („postupné nakladanie“).
- Nakladanie sa zastaví, keď sa dosiahne kapacita separačného stĺpca a separačný program prejde k nasledujúcemu kroku separácie. Po dokončení posledného kroku (finálna elúcia buniek) sa na stĺpec naloží ďalšia časť vzorky.

Premývanie stĺpca

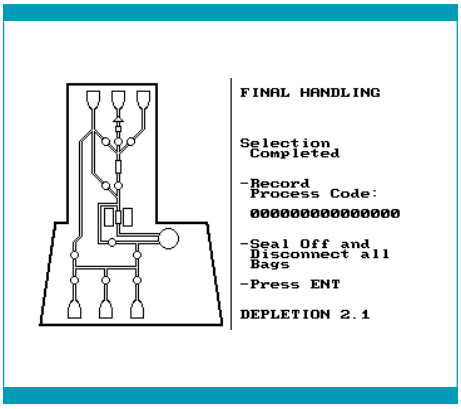
Predradený stĺpec a separačný stĺpec sa dôkladne premyjú, aby sa odstránili všetky neoznačené bunky. Premývací tlmivý roztok sa zhromažďuje vo vaku Buffer Waste Bag.

Finálna elúcia buniek

Magnet sa presunie do polohy „OFF“ (vypnuté). Magneticky označené bunky sa najprv eluujú do vaku Priming Waste Bag. Až po dokončení poslednej fázy nakladania sa všetky magneticky označené bunky (necieľové bunky) uvoľnia zo separačného stĺpca a zhromaždia sa vo vaku Negative Fraction Bag, aby sa znížil prenos s označenými bunkami v hadičkách pumpy.

Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

Po skončení činnosti sa v okne zobrazí Obrazovka 7.84.

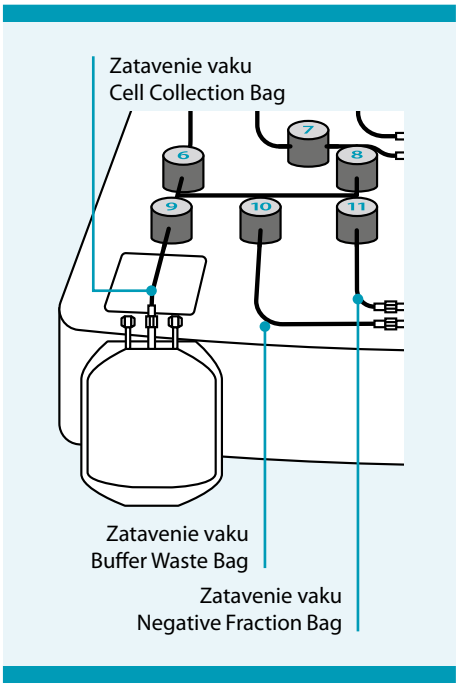


Obrazovka 7.84: Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

1. Zaznamenajte kód procesu.
2. Zasvorkujte alebo zatavte hadičky nad prípojkou luer lock pripájajúcou vak Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Obrázok 7.25).

   V hadičke priamo pod ventilom č. 9 urobte tri hermetické zatavenia. Opatrne oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Cell Collection Bag od súpravy hadičiek.
3. Odvážte naplnený vak Cell Collection Bag. Zaznamenajte hmotnosť.

   Stanovte hmotnosť frakcie cieľových buniek odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujúceho cieľové bunky. Zaznamenajte hmotnosť.
4. Otáčaním vaku dôkladne premiešajte suspenziu cieľových buniek. Odoberte primerané množstvo, napr. 0,5 mL, a uchovajte na analýzu.
5. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičku nad prípojkou luer lock vaku Negative Fraction Bag. V hadičke urobte tri hermetické zatavenia. Oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Negative Fraction Bag.
6. Rovnakým spôsobom odpojte vak Buffer Waste Bag.
7. Odstráňte vaky Negative Fraction Bag a Buffer Waste Bag. Všetky vaky si uchovajte, kým sa nedokončí finálna analýza všetkých buniek.



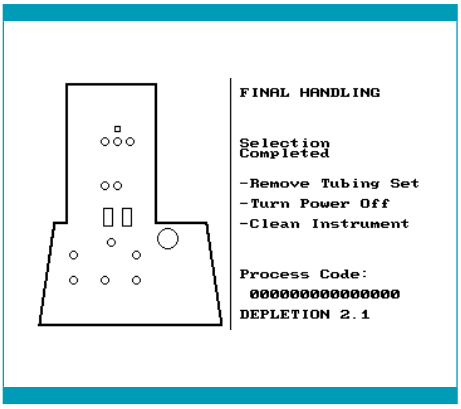
Obrázok 7.25: Odpojenie vakov

Cieľové bunky je teraz možné spracovať v súlade s klinickými protokolmi.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

Okno označuje Obrazovka 7.85.



Obrazovka 7.85: Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

1. Odstráňte súpravu hadičiek: Začnite ventilmi č. 6, 9 a 10 a postupovaním smerom nahor postupne uvoľnite hadičky zo snímača kvapaliny a z ventilov zatlačením na ventily. Uvoľnite stĺpec z držiaka stĺpcov. Súpravu hadičiek zlikvidujte ako biologicky nebezpečný odpad v súlade so štandardnými nemocničnými postupmi.
2. Vypnite prístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistite prístroj podľa odporúčaných pokynov na čistenie – pozrite si časť „Čistenie a dezinfekcia“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument. Postupujte podľa štandardných postupov na zaobchádzanie s infekčnými materiálmi.

Analýza buniek

DÔLEŽITÉ

- Tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie je potrebné pred podaním separovaných cieľových buniek odstraňovať, ak objem neprekročí 100 mL na transplantát pri vhodných rýchlostiach infúzie. Je potrebné zohľadniť stav obličiek pacienta a účinky na elektrolyty v krvi. Predovšetkým u detí je potrebné primerane upraviť rýchlosť infúzie.
- Ak objem frakcie cieľových buniek prekročí 100 mL, je potrebné ho vhodným spôsobom znížiť, napr. odstreďovaním alebo výmenou tlmivého roztoku, na infúzny roztok schválený v krajine používateľa.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko zníženia kvality cieľových buniek. Cieľové bunky musia byť analyzované a musí sa overiť, že spĺňajú používateľské požiadavky, inak môže byť narušená vhodnosť na klinické použitie. Preskúmajte cieľové bunky z hľadiska kvality a kvantity vzhľadom na ich plánované použitie.

Musí to zahŕňať nasledujúce parametre:

- celkový počet leukocytov,
- životaschopnosť a celkový počet cieľových buniek,
- účinnosť ochudobňovania.

Taktiež sa odporúča stanoviť celkový počet leukocytov a životaschopnosť frakcie necieľových buniek. Tento zoznam je iba príkladom a na základe plánovaného použitia a klinických protokolov je potrebné zahrnúť aj ďalšie testy. Zaznamenajte údaje z analýzy.

7.4.5 DEPLETION 3.1

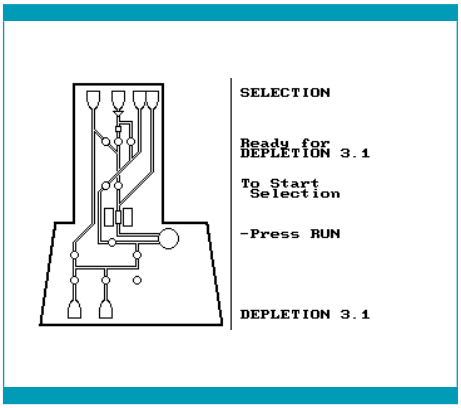
Po dokončení finálnej kontroly je prístroj CliniMACS Plus Instrument pripravený začať separáciu. Okno označuje Obrazovka 7.86.

Pokračujte stlačením tlačidla **RUN**.

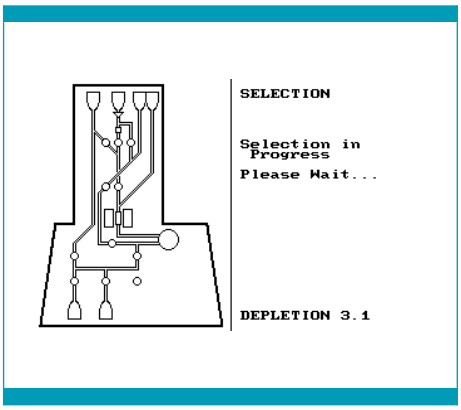
Po stlačení tlačidla **RUN** prístroj automaticky vykoná zvolený postup separácie.

V každej fáze operácie sa zobrazí obrazovka podobná Obrazovka 7.87, ktorá indikuje stav postupu separácie.

Indikátor polohy magnetu sa zobrazuje ako dve čierne políčka vedľa separačného stĺpca, keď je magnet „ON“ (zapnutý), t. j. bol posunutý dopredu, aby zmagnetizoval separačný stĺpec. Ak je indikátor polohy magnetu priehľadný (napr. Obrazovka 7.86), magnet je „OFF“ (vypnutý), t. j. bol posunutý do zadnej časti prístroja. Keď sa magnet vytiahne, separačný stĺpec je mimo magnetického poľa a nie je zmagnetizovaný.



Obrazovka 7.86: Spustenie separácie



Obrazovka 7.87: Priebeh separácie

Postup separácie

Depletion 3.1 je dvojkrokový program ochudobňovania, t. j. bunky sa aplikujú na separačný stĺpec dvakrát.

V prvej časti procesu sa podrobí ochudobňovaniu väčšina označených buniek (Staged Cell Loading [Bulk Loading Stage]). V druhej časti procesu sa podrobí ochudobňovaniu niekoľko málo zostávajúcich označených buniek (Sensitive Sample Loading [Sensitive Loading Stage]).

DÔLEŽITÉ

Na začiatku separácie sa tlmivý roztok pumpuje smerom nahor k vaku Cell Preparation Bag, aby sa naplnil filter Pre-System Filter. Poklepaním niekoľkokrát jemne na bok filtra odstráňte všetky prípadné bubliny, ktoré sa mohli zachytiť vo filtri.

Poznámka: Ak počet magneticky označených buniek (vypočítaný softvérom CliniMACS Plus) prekročí väzobnú kapacitu separačného stĺpca, separačný program automaticky naloží a separuje vzorku buniek na menšie časti („postupné nakladanie“). Medzi jednotlivými fázami nakladania sa separačný stĺpec premyje, aby sa odstránili všetky označené bunky. Označené bunky budú eluované a uchované vo vaku Non-Target Cell Bag. Premývací tlmivý roztok sa zhromažďuje vo vaku Reapplication Bag.

Staged Cell Loading (Bulk Loading Stage)

Postup separácie začína naplnením filtra Pre-System Filter, aby sa dokončilo naplnenie systému. Následne začne separácia označených buniek. Pumpa nasaje obsah vaku Cell Preparation Bag do súpravy hadičiek. Magneticky označené bunky (necieľové bunky) sa zadržiavajú v separačnom stĺpci umiestnenom v magnetickom poli, kým neoznačené bunky (cieľové bunky) prechádzajú cezeň a zhromažďujú sa vo vaku Reapplication Bag.

Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

Na ďalšie ochudobňovanie sa bunky vo vaku Reapplication Bag opätovne naložia do separačného stĺpca nižšou rýchlosťou. Zatiaľ čo niekoľko málo zostávajúcich označených buniek sa teraz zadržiava na stĺpci, neoznačené bunky (cieľové bunky) prúdia cez magnetické pole a zhromažďujú sa vo vaku Cell Collection Bag.

Preplachovanie filtra Pre-System Filter a vaku Reapplication Bag

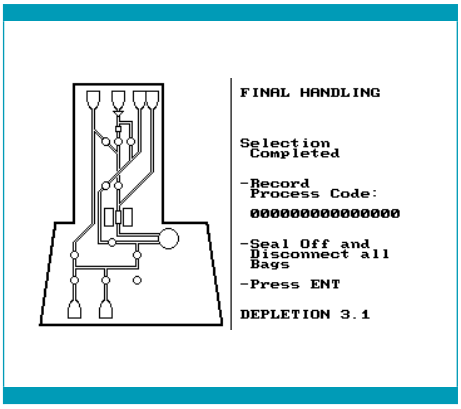
Po tom, čo vzorka buniek dokončí hromadné aj citlivé ochudobňovanie, filter Pre-System Filter a vak Reapplication Bag sa dvakrát prepláchnu tlmivým roztokom, aby sa znížila strata buniek v systéme.

Odstránenie necieľových buniek

Magnet sa presunie do polohy „OFF“ (vypnuté). Magneticky označené bunky (necieľové bunky) sa uvoľnia zo separačného stĺpca a zhromaždia sa vo vaku Non-Target Cell Bag po každej fáze nakladania.

Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

Po skončení činnosti sa v okne zobrazí Obrazovka 7.88.

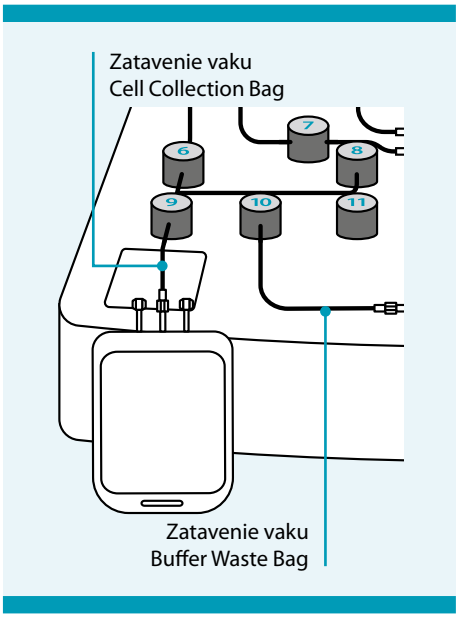


Obrazovka 7.88: Odpojenie vakov a zaznamenanie kódu procesu

1. Zaznamenajte kód procesu.
2. Zasvorkujte alebo zatavte hadičky nad prípojkou luer lock pripájajúcou vak Cell Collection Bag k súprave hadičiek (pozrite si Obrázok 7.26).

   V hadičke priamo pod ventilom č. 9 urobte tri hermetické zatavenia. Opatrne oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Cell Collection Bag od súpravy hadičiek.
3. Odvážte naplnený vak Cell Collection Bag. Zaznamenajte hmotnosť.

   Stanovte hmotnosť frakcie cieľových buniek odpočítaním hmotnosti prázdneho vaku Cell Collection Bag od hmotnosti vaku Cell Collection Bag obsahujúceho cieľové bunky. Zaznamenajte hmotnosť.
4. Otáčaním vaku dôkladne premiešajte suspenziu cieľových buniek. Odoberte primerané množstvo, napr. 0,5 mL, a uchovajte na analýzu.
5. Pomocou tepelného zatavovača zatavte hadičky nad spojkou luer lock vaku Buffer Waste Bag. V hadičke urobte tri hermetické zatavenia. Oddeľte stredné zatavenie, aby ste odpojili vak Buffer Waste Bag.
6. Rovnakým spôsobom odpojte vak Non-Target Cell Bag.



Obrázok 7.26: Odpojenie vakov

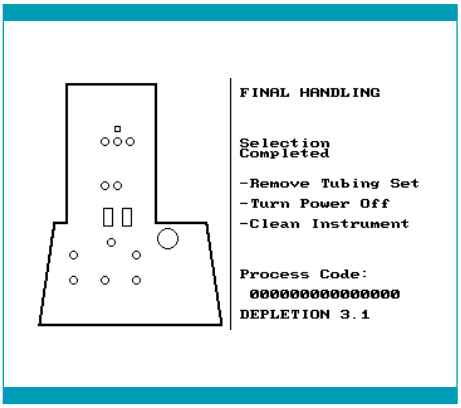
7. Odstráňte vaky Non-Target Cell Bag a Buffer Waste Bag. Všetky vaky si uchovajte, kým sa nedokončí finálna analýza všetkých buniek.

Cieľové bunky je teraz možné spracovať v súlade s klinickými protokolmi.

Pokračujte stlačením tlačidla **ENT**.

Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

Okno označuje Obrazovka 7.89.



Obrazovka 7.89: Odstránenie súpravy hadičiek a vypnutie

1. Odstráňte súpravu hadičiek: Začnite ventilmi č. 6, 9 a 10 a postupovaním smerom nahor postupne uvoľnite hadičky zo snímača kvapaliny a z ventilov zatlačením na ventily. Uvoľnite stĺpec z držiaka stĺpcov. Súpravu hadičiek zlikvidujte ako biologicky nebezpečný odpad v súlade so štandardnými nemocničnými postupmi.
2 Vypnite prístroj CliniMACS Plus Instrument.
3. Vyčistite prístroj podľa odporúčaných pokynov na čistenie – pozrite si časť „Čistenie a dezinfekcia“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument. Postupujte podľa štandardných postupov na zaobchádzanie s infekčnými materiálmi.

Analýza buniek

DÔLEŽITÉ

- Tlmivý roztok CliniMACS PBS/EDTA Buffer nie je potrebné pred podaním separovaných cieľových buniek odstraňovať, ak objem neprekročí 100 mL na transplantát pri vhodných rýchlostiach infúzie. Je potrebné zohľadniť stav obličiek pacienta a účinky na elektrolyty v krvi. Predovšetkým u detí je potrebné primerane upraviť rýchlosť infúzie.
- Ak objem frakcie cieľových buniek prekročí 100 mL, je potrebné ho vhodným spôsobom znížiť, napr. odstreďovaním alebo výmenou tlmivého roztoku, na infúzny roztok schválený v krajine používateľa.

⚠ UPOZORNENIE

Riziko zníženia kvality cieľových buniek. Cieľové bunky musia byť analyzované a musí sa overiť, že spĺňajú používateľské požiadavky, inak môže byť narušená vhodnosť na klinické použitie. Preskúmajte cieľové bunky z hľadiska kvality a kvantity vzhľadom na ich plánované použitie.

Musí to zahŕňať nasledujúce parametre:

- celkový počet leukocytov,
- životaschopnosť a celkový počet cieľových buniek,
- účinnosť ochudobňovania.

Taktiež sa odporúča stanoviť celkový počet leukocytov a životaschopnosť frakcie necieľových buniek. Tento zoznam je iba príkladom a na základe plánovaného použitia a klinických protokolov je potrebné zahrnúť aj ďalšie testy. Zaznamenajte údaje z analýzy.

8 Riešenie problémov

Účelom tejto kapitoly je poskytnúť informácie o prípadných neočakávaných udalostiach, ktoré sa môžu vyskytnúť, a tiež navrhnúť vhodné nápravné opatrenia. Ak potrebujete získať ďalšie informácie, ktoré nie sú uvedené v tejto kapitole, čo najskôr kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Poznámka: Poradie textov v tejto kapitole zodpovedá skutočnej postupnosti separácie.

8.1 Technická podpora Miltenyi Biotec Technical Support

V prípade porúch prístroja alebo zlyhaní procesov, ktoré nedokáže operátor sám odstrániť (chybové hlásenia), kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support:

+49 2204 8306-3803
technicalsupport@miltenyi.com

Kontaktné údaje technickej podpory Miltenyi Biotec Technical Support nájdete na adrese www.miltenyibiotec.com.

8.2 Príprava produktu leukaferézy

Odobratá vzorka sa zriedi

V ideálnom prípade sa magnetické označenie vykonáva v zriedenom produkte leukaferézy. Produkt leukaferézy upravte na finálne riedenie v pomere približne 1 : 3. Ak je prijatá vzorka zriedená viac než v pomere 1 : 3 alebo ak operátor nevie presne, aká je koncentrácia plazmy vo vzorke, pred pridaním činidla pridajte do vzorky imunoglobulín (odporúčaná koncentrácia imunoglobulínu v objeme označovania: 1,5 mg/mL). Počas označovania je dôležité mať vo vzorke určité množstvo imunoglobulínu, aby bola minimalizovaná nešpecifická väzba činidla.

Počet cieľových buniek v produkte leukaferézy je nízky

Mobilizácia kmeňových buniek bola nedostatočná. Skontrolujte analýzu produktu leukaferézy.

■ Nedostatočná životaschopnosť buniek v produkte leukaferézy

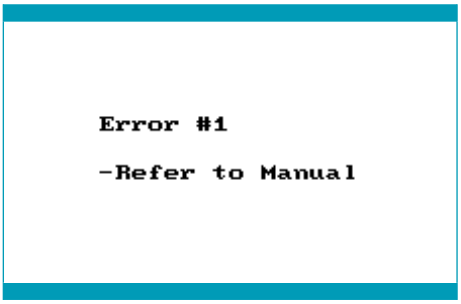
Produkt leukaferézy bol zrejme nesprávne odobratý, skladovaný alebo prepravovaný. Na zaistenie lepšej kvality vzorky je potrebné prípravu a separáciu produktu leukaferézy vykonať bezprostredne po leukaferéze. Produkt leukaferézy uchovávajte pri koncentrácii leukocytov nižšej než $0{,}2\times10^9$ na mL. Podľa potreby zrieďte produkt leukaferézy autológnou plazmou. Pri začatí postupu označovania a separácie by produkt leukaferézy nemal byť starší než 24 hodín. Ak sa produkt leukaferézy musí skladovať, napríklad cez noc, treba ho uchovávať pri regulovanej izbovej teplote (+19 °C až +25 °C [+66 °F až +77 °F]).

8.3 Prístroj CliniMACS Plus Instrument a súpravy hadičiek CliniMACS

8.3.1 Chybové hlásenia

Existuje množstvo možných porúch prístroja alebo softvéru. Tieto sú príslušne označené a budú sa zobrazovať na obrazovke. Týkajú sa interných chýb, ktoré operátor nemôže opraviť. Zaznamenajte číslo chyby a kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Jedno možné chybové hlásenie uvádza Obrazovka 8.1.



Obrazovka 8.1: Chybové hlásenie č. 1

S výnimkou chybových hlásení sú poruchy, ktoré môže operátor opraviť, označené ako „Varovné hlásenia“ (pozrite si časť 8.4.1).

8.3.2 Vloženie a naplnenie súpravy hadičiek

■ Ventil sa neotvorí, keď dostane operátor pokyn na vloženie hadičky do konkrétneho ventilu

Ventily sú navrhnuté tak, aby po vložení hadičky fungovali správne. Ventil otvorte manuálnym stlačením. Počas sekvencie nacvičovania používania ventilu ventil pozorne sledujte. Ak sa ventil počas sekvencie nacvičovania používania ventilu nestlačí, pozrite si časť „Počas sekvencie nacvičovania používania ventilu sa ventil nestlačí“.

■ Počas sekvencie nacvičovania používania ventilu sa ventil nestlačí

Uistite sa, či je hadička vložená správne. Skontrolujte, či sú ventily dôkladne vyčistené. Ventil, ktorý bol kontaminovaný kvapalinou, sa musí vymeniť. Kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

- Počas plnenia uniká zo súpravy hadičiek tlmivý roztok

  Súprava hadičiek je chybná. Vypnite prístroj CliniMACS Plus Instrument a reštartujte plnenie s novou nainštalovanou súpravou hadičiek a dostatočným množstvom nového tlmivého roztoku.

- Po naplnení sa v súprave hadičiek vyskytuje nadbytočný vzduch

  Vak s tlmivým roztokom nie je správne prepichnutý. Použite novú súpravu hadičiek a dostatočné množstvo nového tlmivého roztoku a reštartujte separáciu buniek pomocou systému CliniMACS Plus. Skontrolujte, či je membrána vaku na tlmivý roztok správne prepichnutá.

- Neočakávaný objem tlmivého roztoku vo vakoch po naplnení. Po naplnení by mala byť kvapalina iba vo vakoch Priming Waste Bag a Buffer Waste Bag

  Súprava hadičiek nie je správne namontovaná. Ak súprava hadičiek nie je správne namontovaná alebo ventily nefungujú správne, kvapalina môže unikať za ventily. Odstráňte súpravu hadičiek a vymeňte ju za novú. Postup plnenia reštartujte s dostatočným množstvom nového tlmivého roztoku. Ak súprava hadičiek nie správne vložená, môže dôjsť ku zhoršeniu účinnosti separácie buniek pomocou systému CliniMACS Plus.

- Motor pumpy sa počas plnenia zastaví

  Hadička pumpy nebola vložená správne. Stlačením tlačidla **STOP** prerušte plnenie a „VYPNITE“ a potom znova „ZAPNITE“ napájanie. Počas procesu inštalácie zasvorkujte hadičku tlmivého roztoku pomocou zaisťovacích klieští, opravte polohu hadičky pumpy a pred opätovným spustením sekvencie plnenia odstráňte zaisťovacie kliešte.

8.4 Automatická separácia buniek

8.4.1 Varovné hlásenia

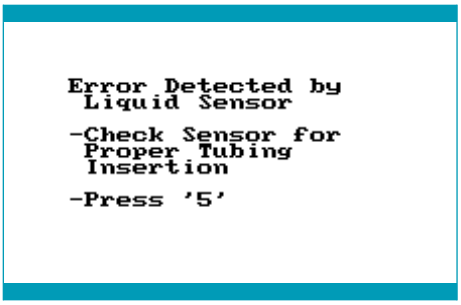
Na rozdiel od chybových hlásení (pozrite si časť 8.3.1) sa varovné hlásenia na obrazovke zobrazia, keď interný kontrolný systém prístroja CliniMACS Plus Instrument rozpozná poruchu, ktorú môže operátor odstrániť. Varovné hlásenie sa obvykle zobrazí v kombinácii so zvukovým signálom („pípnutím“). Ak sa varovné hlásenie zobrazí počas separácie buniek pomocou systému CliniMACS Plus, postupujte podľa pokynov uvedených na obrazovke a pokračujte v separácii buniek. Obecne platí, že varovné hlásenia sa zobrazia po stlačení tlačidla **STOP**, po otvorení dvierok pumpy, keď sa zastaví pumpa alebo keď snímač kvapaliny deteguje chybu.

Vzhľadom na to, že počas rôznych programov separácie sa môžu vyskytnúť rôzne druhy neočakávaných udalostí, je nasledujúca časť rozdelená podľa toho.

8.4.2 Neočakávané udalosti: všetky separačné programy

Chyba detegovaná snímačom kvapaliny

Varovné hlásenie č. 1 sa zobrazí počas počiatočnej fázy procesu nakladania buniek, ak snímač kvapaliny nie je schopný detegovať kvapalinu v hadičke. Vzhľadom na to, že pred nakladaním buniek sa filter Pre-System Filter prepláchne tlmivým roztokom, v tomto okamihu musí byť v hadičke kvapalina.



Obrázok 8.1: Varovné hlásenie č. 1

Skontrolujte nasledujúce body:

1. Je hadička vložená správne? Do snímača kvapaliny? Ak tomu tak nie je, urobte tak.
2. Je hadička naplnená tlmivým roztokom? Ak tomu tak nie je, pozrite si bod 3.
3. Ak nie je hadička naplnená tlmivým roztokom, skontrolujte, či nie je neobsahuje zalomenia obmedzujúce prietok tlmivého roztoku smerom nahor do filtra Pre-System Filter a vaku Cell Preparation Bag. Upravte polohu súpravy hadičiek. V prípade potreby zvýšte alebo znížte vešiaky na vaky pomocou svoriek držiaka na vaky. Upravte polohu hadičiek vo ventiloch. Ak chcete upraviť polohu hadičiek, otvorte ventil manuálnym stlačením tlačidla. Skontrolujte, či hadičky nie sú zalomené, skrútené alebo napnuté.
4. Je vak Cell Preparation Bag správne prepichnutý? Skontrolujte, či hrot filtra Pre-System Filter prenikol cez membránu portu vaku Cell Preparation Bag.
5. Ak súprava hadičiek nie je úplne naplnená tlmivým roztokom: Prenikol hrot pre tlmivý roztok súpravy hadičiek do vaku na tlmivý roztok? Ak potrebujete vykonať opravu, pozrite si kapitolu „Po naplnení sa v súprave hadičiek vyskytuje nadbytočný vzduch“ v časti 8.3.2.

Po vykonaní nápravného opatrenia pokračujte v prebiehajúcej separácii a stlačte tlačidlo **5**. Ak sa po vylúčení všetkých možných príčin uvedených vyššie znova zobrazí varovné hlásenie č. 1, môže sa jednať o poruchu snímača kvapaliny. Kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Bunky sa presunuli do nesprávnej časti súpravy hadičiek. Kvapalina uniká okolo ventilu (ventilov)

- Súprava hadičiek nebola správne vložená. Ak prístroj pokračuje v chode, stlačte tlačidlo **STOP** a zasvorkujte hadičku zaisťovacími kliešťami. Hadičku upravte, pričom najprv stlačte príslušný ventil. Odstráňte zaisťovacie kliešte a stlačením tlačidla **RUN** obnovte separáciu. Ak nestlačíte tlačidlo **RUN** do 600 sekúnd, separácia buniek sa preruší.

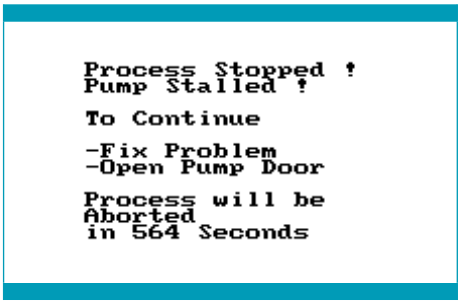
- Ventil nefunguje správne. Stlačte tlačidlo **STOP**. Zasvorkujte hadičku zaisťovacími kliešťami. Ventil niekoľkokrát manuálne stlačte, aby sa uvoľnilo jeho zaseknutie. Odstráňte zaisťovacie kliešte a stlačením tlačidla **RUN** pokračujte. Ak nestlačíte tlačidlo **RUN** do 600 sekúnd, separácia buniek sa preruší. Ak používateľ nedokáže ventil uvoľniť, kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.
- Bol použitý nesprávny softvérový program. Na displeji skontrolujte názov aktuálne používaného programu. Stlačením tlačidla **STOP** prerušte chod a okamžite kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Magnet sa nepohybuje

Pohon magnetu nefunguje. Došlo k poruche pohonu magnetu. Zobrazí sa chybové hlásenie (pozrite si časť 8.3.1). Zaznamenajte si číslo chybového hlásenia a kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

Motor pumpy sa počas separácie buniek zastaví

Hadička pumpy nebola vložená správne, preto sa pumpa nemôže otáčať. V tomto prípade sa v okne na obrazovke zobrazí varovné hlásenie č. 2. Operátor má potom 600 sekúnd na to, aby opravil polohu hadičky pumpy.



Obrazovka 8.2: Varovné hlásenie č. 2

1. Z pumpy opatrne vyberte hadičku pumpy.
2. Skontrolujte, či nedošlo k poškodeniu hadičky pumpy v dôsledku nesprávneho vloženia. Ak je hadička pumpy netesná, zasvorkujte hadičku nad a pod separačným stĺpcom, aby sa zachovali bunky zadržané na stĺpci, a kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.
3. Ak sa hadička pumpy nepoškodila, je možné ju znovu vložiť do telesa pumpy.
4. Stlačením tlačidla **RUN** do 600 sekúnd reštartujte separáciu, v opačnom prípade sa separácia preruší.

Ak je hadička pumpy stlačená a spľasnutá, poukazuje to na upchatý stĺpec. V takom prípade kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.

■ Nakladanie vzorky sa nezastaví napriek tomu, že vak Cell Preparation Bag a filter Pre-System Filter sú prázdne.

Snímač kvapaliny nefunguje správne, napr. z toho dôvodu, že je povrch hadičky v snímači kvapaliny mokrý. Stlačením tlačidla **STOP** prerušte separáciu. Odstráňte hadičku zo snímača kvapaliny. Hadičku a kontaktnú plochu osušte papierovou utierkou alebo absorpčným materiálom. Hadičku v snímači kvapaliny vymeňte a stlačte tlačidlo **RUN**. Sekvenciu neprerušujte na dobu dlhšiu než 600 sekúnd, inak sa separácia buniek ukončí.

Ak nie je možné týmto spôsobom aktivovať snímač kvapaliny, stlačte tlačidlo **STOP**, potom tlačidlo **2** a potvrďte to tlačidlom **ENT**, čím preskočíte nakladanie vzorky a budete pokračovať v separácii.

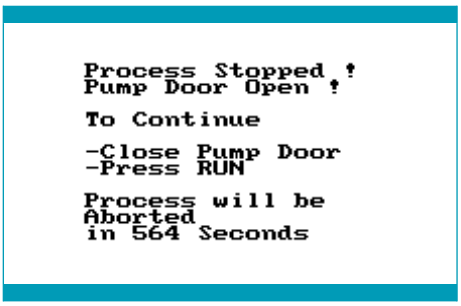
8.4.3 Neočakávané udalosti: iba programy obohacovania

■ Chod sa preruší pred dokončením programu separácie buniek

- Dvierka pumpy sú otvorené: Pri otvorení dvierok pumpy počas chodu prístroja sa z bezpečnostných dôvodov automaticky zastaví prebiehajúca separácia. V okne na obrazovke sa zobrazí hlásenie č. 5.

  Zavrite dvierka pumpy a stlačte tlačidlo **RUN**.

  Ak ako v tomto prípade nedôjde k stlačeniu tlačidla **RUN** do 600 sekúnd, separácia sa preruší a separácia buniek sa nedokončí. Spustením NÚDZOVÉHO PROGRAMU získajte čo najviac vzorky zo súpravy hadičiek.



Obrazovka 8.3: Varovné hlásenie č. 5

- Výpadok napájania: V prípade výpadku napájania dôjde k ukončeniu separácie buniek pomocou systému CliniMACS Plus. Po obnovení napájania sa separácia buniek nedokončí. Spustením NÚDZOVÉHO PROGRAMU získajte čo najviac vzorky zo súpravy hadičiek.

8.4.4 Neočakávané udalosti: CD34 SELECTION 1/2

- Nakladanie sa zastavilo pred naložením celej vzorky na stĺpce

  Filter Pre-System Filter sa upchal v dôsledku veľkého množstva bunkových zvyškov alebo z dôvodu neúplného naplnenia filtra. Z dôvodu pokračujúceho pumpovania došlo k vytvoreniu podtlaku, ktorý spôsobil vznik vzduchových bublín aktivujúcich snímač kvapaliny. Proces separácie preto pokračoval s premývaním stĺpca skôr, než sa mohla naložiť celá vzorka. Po zastavení sekvencie nakladania nie je možné opätovne spustiť nakladanie vzorky.

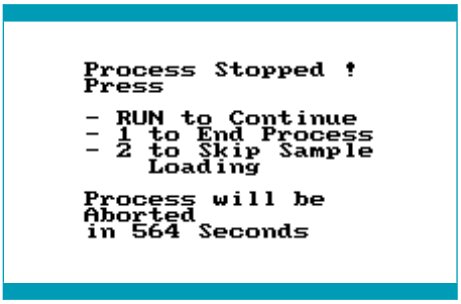
  Umožnite prístroju CliniMACS Plus Instrument dokončiť separačný program. Neprerušujte aktuálny chod, pretože by to mohlo spôsobiť zbytočnú stratu buniek. Po dokončení postupu separácie prefiltrujte zostávajúcu vzorku pomocou 200 µm integrovaného krvného filtra a preneste ju do nového transferového vaku. Potom ihneď vykonajte druhú separáciu s novou súpravou hadičiek a dostatočným množstvom nového tlmivého roztoku.

- Počas nakladania buniek hadička pumpy spľasla a/alebo sa v súprave hadičiek pod predradeným stĺpcom objavilo nadmerné množstvo vzduchu

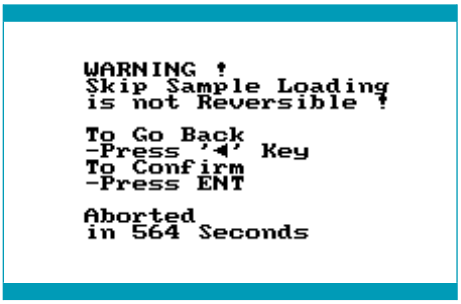
  V dôsledku veľkého množstva zvyškov buniek vo vaku Cell Preparation Bag sa upchal predradený stĺpec. Je potrebné manuálne preskočiť nakladanie zvyšku vzorky a pokračovať v separácii s bunkami, ktoré už boli naložené do systému.

1. Stlačením tlačidla **STOP** prerušte nakladanie buniek. Zobrazí sa varovné hlásenie č. 3.
2. Stlačením tlačidla **2** preskočte proces nakladania buniek.

   Zobrazí sa varovné hlásenie č. 4, ktoré poskytne operátorovi možnosť potvrdiť alebo zmeniť rozhodnutie, pretože preskočenie nakladania vzorky nie je možné vrátiť späť.
3. Stlačte tlačidlo **ENT** a separačný program zastaví nakladanie vzorky a bude pokračovať v premývaniach stĺpca.



Obrazovka 8.4: Varovné hlásenie č. 3



Obrazovka 8.5: Varovné hlásenie č. 4

Zosvorkujte hadičku pod filtrom Pre-System Filter, aby sa zabránilo úniku buniek z vaku Cell Preparation Bag do súpravy hadičiek. Po dokončení postupu separácie prefiltrujte zostávajúcu vzorku pomocou 200 µm integrovaného krvného filtra a preneste ju do nového transferového vaku.

Potom ihneď vykonajte druhú separáciu s novou súpravou hadičiek a dostatočným množstvom nového tlmivého roztoku.

8.4.5 Neočakávané udalosti: ENRICHMENT 1.1

- Nakladanie sa zastavilo pred naložením celej vzorky na stĺpce

  Filter Pre-System Filter sa upchal v dôsledku veľkého množstva bunkových zvyškov alebo z dôvodu neúplného naplnenia filtra. Z dôvodu pokračujúceho pumpovania došlo k vytvoreniu podtlaku, ktorý spôsobil vznik vzduchových bublín. Tým došlo k aktivácii kvapalinového snímača a proces separácie pokračoval priamo finálnou fázou nakladania vzorky. Po ukončení separácie môže časť vzorky zostať vo vaku Cell Preparation Bag.

  Umožnite prístroju CliniMACS Plus Instrument dokončiť separačný program. Neprerušujte aktuálny chod, pretože by to mohlo spôsobiť zbytočnú stratu buniek.

  Pri nastavovaní prístroja (KROK 2) stanovte celkový počet buniek, percento cieľových buniek a zostávajúci objem nakladanej vzorky do vaku Cell Preparation Bag a zadajte aktuálne parametre vzorky. Po dokončení postupu separácie prefiltrujte zostávajúcu vzorku pomocou 200 µm integrovaného krvného filtra a preneste ju do nového transferového vaku. Potom ihneď vykonajte druhú separáciu s novou súpravou hadičiek a dostatočným množstvom nového tlmivého roztoku.

- Boli zadané nesprávne hodnoty parametrov vzorky

  Zadaný objem nakladanej vzorky bol nižší než skutočný objem v pripojenom vaku Cell Preparation Bag. Po zastavení nakladania vzorky ho nie je možné opätovne spustiť.

  Umožnite prístroju CliniMACS Plus Instrument dokončiť separačný program. Neprerušujte aktuálny chod, pretože by to mohlo spôsobiť zbytočnú stratu buniek.

  Pri nastavovaní prístroja (KROK 2) stanovte celkový počet buniek, percento cieľových buniek a zostávajúci objem nakladanej vzorky do vaku Cell Preparation Bag a zadajte aktuálne parametre vzorky. Zostávajúcu vzorku spracujte pomocou novej súpravy hadičiek, nového filtra Pre-System Filter a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku.

- Motor pumpy sa zastaví počas elúcie cieľových buniek do vaku Cell Collection Bag

  Zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Collection Bag nie sú počas elučnej sekvencie otvorené. Z tohto dôvodu je cesta k vaku Cell Collection Bag zablokovaná.

  Stlačte tlačidlo **STOP** a otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Collection Bag. Otvorte dvierka pumpy a skontrolujte, či je hadička pumpy vložená správne. Zavrite dvierka pumpy a do 600 sekúnd stlačte tlačidlo **RUN**, aby sa elučná sekvencia reštartovala.

8.4.6 Neočakávané udalosti: ENRICHMENT 3.2

- Nakladanie sa zastavilo pred naložením celej vzorky na stĺpce

  Filter Pre-System Filter sa upchal v dôsledku veľkého množstva bunkových zvyškov alebo z dôvodu neúplného naplnenia filtra. Z dôvodu pokračujúceho pumpovania došlo k vytvoreniu podtlaku, ktorý spôsobil vznik vzduchových bublín. Tým došlo k aktivácii kvapalinového snímača a proces separácie pokračoval premývaním stĺpca pred naložením celej vzorky. Po zastavení sekvencie nakladania nie je možné opätovne spustiť nakladanie vzorky.

  Umožnite prístroju CliniMACS Plus Instrument dokončiť separačný program. Neprerušujte aktuálny chod, pretože by to mohlo spôsobiť zbytočnú stratu buniek.

  Po dokončení postupu separácie prefiltrujte zostávajúcu vzorku pomocou 200 µm integrovaného krvného filtra a preneste ju do nového transferového vaku. Potom ihneď vykonajte druhú separáciu s novou súpravou hadičiek a dostatočným množstvom nového tlmivého roztoku.

- Motor pumpy sa zastaví počas elúcie cieľových buniek do vaku Cell Collection Bag

  Zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Collection Bag nie sú počas elučnej sekvencie otvorené. Z tohto dôvodu je cesta k vaku Cell Collection Bag zablokovaná.

Stlačte tlačidlo STOP a otvorte zaisťovacie kliešte vedľa vaku Cell Collection Bag. Otvorte dvierka pumpy a skontrolujte, či je hadička pumpy vložená správne. Zavrite dvierka pumpy a do 600 sekúnd stlačte tlačidlo RUN, aby sa elučná sekvencia reštartovala.

8.4.7 Núdzový program (na použitie iba s programami obohacovania)

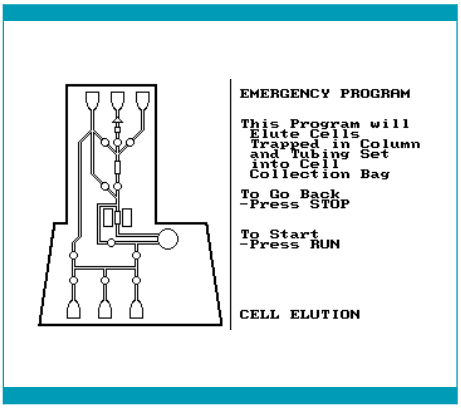
Ak sa z akéhokoľvek dôvodu beh nezvratne ukončí pred elúciou cieľových buniek zo separačného stĺpca, je na elúciu buniek zo separačného stĺpca možné spustiť núdzový program. Tento program bol navrhnutý iba na použitie so všetkými programami obohacovania spolu so súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set (REF 161-01) alebo súpravou hadičiek CliniMACS Tubing Set LS (REF 162-01).

Núdzový program sa nesmie používať so žiadnymi programami ochudobňovania.

Poznámka: Núdzový program eluuje približne 75 mL tekutiny. Skontrolujte, či je k súprave hadičiek pripojený vhodný vak Cell Collection Bag.

1. Na potvrdenie, že separačný stĺpec nie je zmagnetizovaný, prístroj vypnite, počkajte 5 sekúnd a potom ho opäť zapnite. Magnet sa vysunie z magnetickej separačnej jednotky (pozrite si časť„Popis“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument). Skontrolujete to tak, že k magnetickej separačnej jednotke priložíte malý predmet, ktorý je možné zmagnetizovať. Ak sa magnet nevysunie alebo ak dochádza k trvalému výpadku napájania, kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.
2. Počkajte, pokiaľ sa v okne nezobrazí hlavná obrazovka (pozrite si časť „Inštalácia“ v používateľskej príručke k prístroju CliniMACS Plus Instrument).

   Na vyvolanie núdzového programu stlačte tlačidlo 4. Okno označuje Obrazovka 8.6.



Obrazovka 8.6: Núdzový program

3. Na pokračovanie v elúcii zachytených buniek stlačte tlačidlo RUN.

   Poznámka: Na opustenie núdzového programu bez začatia elúcie zachytených buniek stlačte tlačidlo STOP.

4. Eluované bunky zhromaždené vo vaku Cell Collection Bag preneste do nového 600 mL transferového vaku. Zvyšné bunky vo vaku Cell Preparation Bag nakoniec zlúčte s bunkami eluovanými núdzovým programom. Spustite nový postup separácie s použitím novej súpravy hadičiek a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku.

8.4.8 Neočakávané udalosti: DEPLETION 2.1

- Cieľové bunky sa nedostanú do vaku Cell Collection Bag

  Pumpa nedokáže vykonať naloženie produktu z vaku Cell Preparation Bag, pretože svorka vedľa vaku Cell Collection Bag nie je počas sekvencie nakladania buniek otvorená. Stlačte tlačidlo **STOP** a otvorte svorku vedľa vaku Cell Collection Bag. Pokračujte v procese ochudobňovania stlačením tlačidla **RUN**.

  Umožnite prístroju CliniMACS Plus Instrument dokončiť separačný program. Neprerušujte aktuálny chod, pretože by to mohlo spôsobiť zbytočnú stratu buniek. Ak po skončení postupu ochudobňovania zostane vo vaku Cell Preparation Bag časť produktu, zvyšné bunky spracujte pomocou novej súpravy hadičiek, nového filtra Pre-System Filter a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku.

  Pri nastavovaní prístroja (KROK 2) stanovte celkový počet buniek, percento označených buniek a objem nakladanej vzorky, zadajte aktuálne parametre vzorky a spustite nové ochudobňovanie.

- Nakladanie sa zastavilo pred naložením celej vzorky na stĺpce

  Vzduchové bubliny zo vzorky a/alebo z filtra Pre-System Filter aktivovali snímač kvapaliny skôr, než sa naložila celá vzorka. Prerušte aktuálny chod a skontrolujte celkový počet buniek a účinnosť ochudobňovania buniek vo vaku Cell Collection Bag. Podľa potreby zostávajúcu vzorku spracujte pomocou novej súpravy hadičiek, nového filtra Pre-System Filter a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku.

  Pri nastavovaní prístroja (KROK 2) stanovte celkový počet buniek, percento označených buniek a objem nakladanej vzorky, zadajte aktuálne parametre vzorky a spustite nové ochudobňovanie.

8.4.9 Neočakávané udalosti: DEPLETION 3.1

- Nakladanie sa zastavilo počas fázy Staged Cell Loading pred naložením celej vzorky na stĺpce

  - Filter Pre-System Filter bol vložený nesprávnym spôsobom. Funkcia kvapkacej komôrky preto nie je k dispozícii a vzduchové bubliny môžu prejsť priamo cez kvapalinový snímač, čo spôsobí ukončenie nakladania vzorky pred naložením celej vzorky. Prístroj pokračuje v procese ochudobňovania tým, že priamo spustí ďalší krok. Po zastavení nakladania vzorky ho nie je možné opätovne spustiť.
  - Filter Pre-System Filter sa upchal v dôsledku veľkého množstva bunkových zvyškov alebo z dôvodu neúplného naplnenia filtra. Z dôvodu pokračujúceho pumpovania došlo k vytvoreniu podtlaku, ktorý spôsobil vznik vzduchových bublín. Tým došlo k aktivácii kvapalinového snímača a proces separácie pokračoval priamo finálnou fázou nakladania vzorky. Po ukončení separácie môže časť vzorky zostať vo vaku Cell Preparation Bag.

Prerušte aktuálny chod a zlúčte obsah vakov Reapplication Bag a Cell Preparation Bag. Zostávajúce bunky spracujte pomocou novej súpravy hadičiek, nového filtra Pre-System Filter a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku.

- Nakladanie sa zastavilo počas fázy Sensitive Sample Loading (Sensitive Loading Stage)

  Vak Reapplication Bag visí nižšie než vak Cell Preparation Bag. Počas kroku citlivého nakladania sa vak Cell Preparation Bag vyprázdni skôr, než sa kompletne naloží objem vaku Reapplication Bag. Preto je možné, že vzduchová bublina aktivuje snímač kvapaliny skôr, než sa vzorka úplne naloží z vaku Reapplication Bag po dokončení postupu ochudobňovania. Po zastavení nakladania vzorky ho nie je možné opätovne spustiť.

  Umožnite prístroju CliniMACS Plus Instrument dokončiť separačný program. Neprerušujte aktuálny chod, pretože by to mohlo spôsobiť zbytočnú stratu buniek. Zostávajúcu vzorku spracujte pomocou novej súpravy hadičiek, filtra Pre-System Filter a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku.

  Pri nastavovaní prístroja (KROK 2) stanovte celkový počet buniek, percento označených buniek a objem nakladanej vzorky a zadajte aktuálne parametre vzorky. Zvážte povinné použitie troch veľkých vešiakov na vaky pre program DEPLETION 3.1 a pozrite si návod na inštaláciu s pokynmi na stanovenie vhodných výšok vakov (pozrite si časť 7.3.3).

- Cieľové bunky (neoznačené bunky) sa nedostanú do vaku Reapplication Bag počas fázy Staged Cell Loading Bulk (Loading Stage)

  Do ventilu č. 3 je vložená nesprávna hadička (pravá vetva hadičky vaku Reapplication Bag namiesto ľavej vetvy (armatúra v tvare T) hadičky). Stlačte tlačidlo **STOP** a z ventilu č. 3 odstráňte nesprávnu hadičku. Manuálne vložte správnu hadičku (ľavá vetva hadičky vaku Reapplication Bag) do ventilu č. 3 podľa opisu v návode na inštaláciu. Stlačením tlačidla **RUN** do 600 sekúnd pokračujte v postupe ochudobňovania.

  Umožnite prístroju CliniMACS Plus Instrument dokončiť separačný program. Neprerušujte aktuálny chod, pretože by to mohlo spôsobiť zbytočnú stratu buniek. Skontrolujte účinnosť ochudobňovanie cieľovej frakcie vo vaku Cell Collection Bag. Ak nie je účinnosť ochudobňovania dostatočná, zopakujte postup ochudobňovania pomocou novej súpravy hadičiek, nového filtra Pre-System Filter a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku.

  Pri nastavovaní prístroja (KROK 2) stanovte celkový počet buniek, percento označených buniek a objem nakladanej vzorky, zadajte aktuálne hodnoty parametrov vzorky a spustite nové ochudobňovanie.

Bunky prúdia do vaku s tlmivým roztokom počas krokov gravimetrického preplachovania

Vak na tlmivý roztok visí príliš nízko (nižšie než vak Cell Preparation Bag). Stlačte tlačidlo **STOP** a upravte zavesenie vaku na tlmivý roztok do správnej polohy. Skontrolujte, či sú pre program DEPLETION 3.1 nainštalované tri veľké vešiaky na vaky a pozrite si návod na inštaláciu s pokynmi na stanovenie vhodných výšok vakov (pozrite si časť 7.3.3).

- Ak sa bunky nedostali do vaku na tlmivý roztok, stačí manuálne otvoriť ventily č. 1 a 2 a umožniť krátke spätné prepláchnutie buniek do vaku Cell Preparation Bag. Keď bude hadička vaku na tlmivý roztok opäť čistá, zavrite ventily č. 1 a 2 a stlačením tlačidla **RUN** do 600 sekúnd pokračujte v postupe ochudobňovania.
- Ak sa už bunky dostali do vaku na tlmivý roztok, vak na tlmivý roztok vymeňte, manuálne otvorte ventily č. 1 a 2 na krátke prepláchnutie hadičky vaku na tlmivý roztok a stlačením tlačidla **RUN** do 600 sekúnd pokračujte v postupe ochudobňovania. Podľa potreby spracujte zostávajúcu vzorku vo vaku na tlmivý roztok (ak objem prekročí 300 mL, preneste vzorku najprv do vaku na odstreďovanie na zníženie objemu) pomocou novej súpravy hadičiek, nového filtra Pre-System Filter a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku.

Motor pumpy sa zastaví počas prvej elúcie označených buniek do vaku Non-Target Cell Bag

- Po teste integrity neboli odstránené zaisťovacie kliešte. Stlačte tlačidlo **STOP** a odstráňte zaisťovacie kliešte. Otvorte dvierka pumpy a skontrolujte, či je hadička pumpy vložená správne. Zavrite dvierka pumpy a do 600 sekúnd stlačte tlačidlo **RUN**, aby sa elučná sekvencia reštartovala.
- Do ventilu č. 3 je vložená nesprávna hadička (hadička vaku Non-Target Cell Bag namiesto ľavej vetvy (armatúra v tvare T) hadičky vaku Reapplication Bag). Stlačte tlačidlo **STOP** a odstráňte hadičku vaku Non-Target Cell Bag z ventilu č. 3. Manuálne vložte správnu hadičku (ľavá vetva hadičky vaku Reapplication Bag) do ventilu č. 3 podľa opisu v návode na inštaláciu. Do 600 sekúnd stlačte tlačidlo **RUN**, aby sa elučná sekvencia reštartovala.

8.5 Účinnosť separácie buniek

8.5.1 Neočakávané udalosti: iba programy obohacovania

Výťažnosť cieľových buniek je nízka

- Cieľové bunky boli činidlom slabo označené:
  - Vypršala doba použiteľnosti činidla. Skontrolujte dátum najneskoršej spotreby. Nepoužívajte činidlo po dátume najneskoršej spotreby.
  - Činidlo nebolo správne skladované. Skontrolujte teplotu skladovania. Nepoužívajte činidlo, ktoré bolo nesprávne skladované (pozrite si návod na použitie činidla).
  - Nebol dodržaný odporúčaný postup označenia. Pozrite si časti týkajúce sa prípravy vzorky a postupu separácie v používateľskej príručke.
- Počas prípravných krokov došlo k strate buniek.
  - Bunky boli spolu so supernatantom uložené do vakov Plasma Waste Bag a Wash Waste Bag kvôli neúplnej sedimentácii alebo príliš skorej resuspenzii buniek, napr. pri vyberaní vaku z odstredivky. Porovnajte obsah leukocytov v neoznačenom bunkovom produkte a v označenom bunkovom produkte. Skontrolujte správnosť nastavení odstreďovania. Stanovte počet buniek zo všetkých odpadových vakov.
  - Tlmivý roztok neobsahoval HSA. Doplňte tlmivý roztok o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.) (pozrite si časť „Potrebné materiály CliniMACS“ pre príslušnú aplikáciu).
  - Nastavenia odstredivky neboli optimálne. Skontrolujte nastavenia odstreďovania.
  - Nevyváženosť odstredivky alebo použitie brzdy alebo asymetrické naloženie odstredivky.
- Analýza bola nesprávna.
  - Pri odbere vzoriek došlo k chybe. Skontrolujte, či sa v bunkovej suspenzii nenachádzajú zhluky buniek alebo ich usadeniny. Overte, či boli odobraté reprezentatívne vzorky, a analýzu zopakujte.
  - Došlo k chybe pri farbení. Skontrolujte činidlá prietokovej cytometrie. Zopakujte farbenie.
  - Prietokový cytometer bol nesprávne nastavený. Skontrolujte nastavenia prístroja.

Čistota cieľových buniek je nízka.

- Bunkový produkt bol nevhodne skladovaný. Prípravu a separáciu bunkového produktu je potrebné vykonať bezprostredne po leukaferéze. Bunkový produkt uchovávajte pri koncentrácii leukocytov nižšej než $0,2\times10^9$ na mL. Podľa potreby zrieďte bunkový produkt autológnou plazmou. Pri začatí postupu označovania a separácie by bunkový produkt nemal byť starší než 24 hodín. Ak sa bunkový produkt musí skladovať, napríklad cez noc, treba ho uchovávať pri regulovanej izbovej teplote (+19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).
- Nebol dodržaný protokol magnetického označovania (napr. nesprávny objem počas magnetického označovania). Postupujte podľa pokynov na magnetické označovanie (pozrite si KROK 1 v časti pre príslušnú aplikáciu). Na účely riešenia problémov stanovte podskupiny leukocytov (B bunky, T bunky, monocyty, granulocyty, ako aj trombocyty), ktoré kontaminujú cieľovú bunkovú frakciu, a kontaktujte technickú podporu Miltenyi Biotec Technical Support.
- Vysoký počet granulocytov kontaminoval východiskový produkt (neoptimálne nastavenie aferézy). Odumierajúce granulocyty sa potom nešpecificky naviažu na činidlo CliniMACS, čo môže mať za následok zníženie čistoty cieľových buniek.
- Vyskytla sa porucha funkcie ventilov. Eluovaná frakcia cieľových buniek sa kontaminovala časťou necieľovej frakcie alebo odpadovou frakciou tlmivého roztoku. Skontrolujte umiestnenie hadičiek vo ventiloch, aby sa zabezpečila ich správna funkcia. Vyhodnoťte obsah cieľových buniek v necieľovej bunkovej frakcii a odpadovom tlmivom roztoku. Podľa potreby zlúčte cieľovú a necieľovú bunkovú frakciu, zredukujte ju na vhodný objem a zopakujte separáciu s novou súpravou hadičiek a dostatočným množstvom nového tlmivého roztoku.

Nešpecifické zachytávanie odumretých buniek z bunkového produktu alebo vysoké nešpecifické straty buniek počas celého postupu

- Tlmivý roztok neobsahuje HSA. Doplňte tlmivý roztok o HSA na finálnu koncentráciu 0,5 % (hmotn./obj.) (pozrite si časť „Potrebné materiály CliniMACS“ pre príslušnú aplikáciu).
- Bunkový produkt bol zrejme nevhodne skladovaný. Prípravu a separáciu bunkového produktu je potrebné vykonať bezprostredne po leukaferéze. Bunkový produkt uchovávajte pri koncentrácii leukocytov nižšej než $0,2\times10^9$ na mL. Podľa potreby zrieďte bunkový produkt autológnou plazmou. Pri začatí postupu označovania a separácie by bunkový produkt nemal byť starší než 24 hodín. Ak sa bunkový produkt musí skladovať, napríklad cez noc, treba ho uchovávať pri regulovanej izbovej teplote (+19 až +25 °C [+66 až +77 °F]).
- Neúplné naloženie vzorky v dôsledku upchatia separačného stĺpca, filtra Pre-System Filter alebo predradeného stĺpca. Skontrolujte celkový počet buniek a účinnosť ochudobňovania zvyšných buniek.

8.5.2 Neočakávané udalosti: CD34 SELECTION 1/2, ENRICHMENT 1.1

■ Čistota cieľových buniek je nízka

Elúcia zo separačného stĺpca bola neúplná.

- Separačný program bol prerušený. Skontrolujte, či sa na obrazovke zobrazuje chybové hlásenie. Pokračujte časťou „Chod sa preruší pred dokončením programu separácie buniek“ (pozrite si časť 8.4.3 na strane 216).
- Došlo k poruche pumpy alebo ventilu. Získajte bunky zo súpravy hadičiek pomocou núdzového programu opisovaného v časti 8.4.7. Skontrolujte objemy všetkých frakcií. Vyhodnoťte obsah cieľových buniek vo vakoch Buffer Waste Bag a Negative Fraction Bag.
- Hadička vedúca do vaku Cell Collection Bag je upchatá. Skontrolujte súpravu hadičiek, či neobsahuje uzavreté svorky, oklúzie alebo zalomenia.
- Bola prekročená kapacita činidiel a/alebo súpravy hadičiek. Overte si limit kapacity príslušnej aplikácie.
- Hadička nebola správne vložená. Skontrolujte všetky ventily, či majú správne zasunuté hadičky.

8.5.3 Neočakávané udalosti: CD34 SELECTION 1/2

■ Čistota cieľových buniek je nízka

Necieľové bunky boli zadržané.

- Mobilizácia cieľových buniek bola nedostatočná. Počet cieľových buniek bol veľmi nízky. Nízky počet kontaminujúcich necieľových buniek (napr. granulocyty, monocyty, trombocyty) môže preto spôsobiť zníženie čistoty.
- Pri magnetickom označovaní bolo prítomné nedostatočné množstvo plazmy alebo imunoglobulínov. Postupujte podľa pokynov na magnetické označovanie (pozrite si KROK 1 príslušnej aplikácie).

  Ak nie je možné zaručiť finálnu koncentráciu približne 30 % autológnej plazmy vo vzorke počas magnetického označovania, do vzorky pridajte imunoglobulín. Na účinné blokovanie nešpecifickej väzby činidla sa počas magnetického označovania odporúča finálna koncentrácia 1,5 mg/mL.

8.5.4 Neočakávané udalosti: ENRICHMENT 1.1

■ Výťažnosť cieľových buniek je nízka

Nesprávne zadanie parametrov vzorky. Vykonajte krížovú kontrolu zadania parametrov s výsledkami analýzy.

8.5.5 Neočakávané udalosti: DEPLETION 2.1 a DEPLETION 3.1

Účinnosť ochudobňovania je nízka

Ak nie je účinnosť ochudobňovania dostatočná, spracujte zvyšnú vzorku pomocou novej súpravy hadičiek a dostatočného množstva nového tlmivého roztoku. Je potrebné zvážiť nové označenie buniek určených na ochudobňovanie. Stanovte počet buniek a percento buniek určených na ochudobňovanie a zadajte skutočné parametre vzorky počas nastavovania prístroja (KROK 2). Ak sa objavia viditeľné zhluky, môže byť vhodné bunky pred novým chodom prefiltrovať. Zohľadnite, že v dôsledku zhlukovania a dodatočnej filtrácie môže dôjsť k strate buniek.

- Bola prekročená kapacita činidiel a/alebo súpravy hadičiek. Overte si limit kapacity príslušnej aplikácie.
- Nesprávne stanovenie buniek, ktoré sa majú označiť činidlom.
- Nesprávne zadanie parametrov vzorky. Vykonajte krížovú kontrolu zadania parametrov s výsledkami analýzy.
- Znížená životaschopnosť buniek. Odumreté bunky sa môžu nešpecificky naviazať na separačný stĺpec, čo môže mať za následok zníženie označovacej kapacity stĺpca a prípadne i nižšiu účinnosť ochudobňovania. Zabezpečte vyššiu kvalitu bunkového produktu a produkt spracovávajte čo najčerstvejší. Produkty skladované dlhšie než 24 hodín sa nesmú používať. Ak je skladovanie nevyhnutné, bunkový produkt treba uchovávať pri regulovanej izbovej teplote (+19 až +25 °C [+66 až +77 °F]). Koncentrácia buniek by nemala prekročiť $0{,}2\times10^{9}$/mL. Podľa potreby zrieďte bunkový produkt autológnou plazmou, aby bola dosiahnutá optimálna koncentrácia buniek.

9 Právne poznámky

9.1 Obmedzená záruka

S výnimkou toho, čo je uvedené v osobitnom záručnom vyhlásení, ktoré môže byť priložené k vášmu produktu od spoločnosti Miltenyi Biotec, alebo pokiaľ nie je písomne dohodnuté inak náležite oprávneným zástupcom spoločnosti Miltenyi Biotec, platí, že záruka spoločnosti Miltenyi Biotec na akýkoľvek produkt zakúpený priamo od spoločnosti Miltenyi Biotec podlieha zmluvným podmienkam predaja, na základe ktorých vám ju poskytla príslušná obchodná organizácia spoločnosti Miltenyi Biotec. Platné zmluvné podmienky predaja sa môžu líšiť v závislosti od krajiny a oblasti. Tieto zmluvné podmienky sú k dispozícii na požiadanie alebo na adrese www.miltenyibiotec.com. Nič z toho, čo je uvedené v tejto dokumentácii, by sa nemalo považovať za ustanovenie doplnkovej záruky.

Na produkty zakúpené od nezávislých maloobchodníkov alebo predajcov (napr. zakúpené od miestneho autorizovaného servisu spoločnosti Miltenyi Biotec) sa môžu vzťahovať odlišné zmluvné podmienky.

Informácie o záruke poskytnutej na váš produkt nájdete na dodacom liste, faktúre, príjmovom doklade alebo inom doklade o predaji. Niektoré komponenty v zakúpenej kombinácii produktov môžu mať kratšiu záruku, než je záruka uvedená na baliacom liste, faktúre, príjmovom doklade alebo inom doklade o predaji (napr. v prípade tovaru podliehajúceho kratšej trvanlivosti a zastaraniu).

Záruka spoločnosti Miltenyi Biotec na tento produkt sa vzťahuje iba na jeho problémy spôsobené materiálovými alebo výrobnými chybami počas bežného používania. Nevzťahuje sa na problémy produktu spôsobené akýmkoľvek iným dôvodom, okrem iného vrátane problémov produktu v dôsledku jeho používania iným spôsobom, než je výslovne uvedený v tejto príručke, ako napríklad: nevhodným alebo nesprávnym použitím, nesprávnou montážou alebo inštaláciou operátorom alebo treťou stranou, primeraným opotrebovaním, nedbanlivosťou alebo nesprávnou obsluhou, nesprávnym zaobchádzaním, skladovaním, servisom alebo údržbou, nedodržiavaním prevádzkových pokynov, neoprávnenou úpravou tohto produktu alebo akejkoľvek jeho časti alebo použitím nevhodného spotrebného materiálu, príslušenstva alebo pracovných materiálov.

Záruka spoločnosti Miltenyi Biotec sa nevzťahuje na produkty predávané AKO STOJA A LEŽIA alebo SO VŠETKÝMI CHYBAMI ani na spotrebný materiál. Nič z toho, čo je uvedené v tejto dokumentácii, by sa nemalo považovať za ustanovenie doplnkovej záruky.

Ak sa na základe tejto záruky uplatňuje reklamácia, musí byť o tom okamžite informovaná spoločnosť Miltenyi Biotec. Ak sa v záručnej dobe vyskytne nejaká chyba materiálov alebo výrobná chyba, spoločnosť Miltenyi Biotec podnikne príslušné kroky na obnovenie úplnej použiteľnosti prístroja.

Obmedzenie náhrady škôd – spoločnosť Miltenyi Biotec nenesie zodpovednosť za žiadne náhodné ani následné škody vyplývajúce z porušenia akejkoľvek výslovnej alebo implicitnej záruky alebo podmienky týkajúcej sa tohto produktu.

Niektoré krajiny/štáty alebo jurisdikcie neumožňujú vylúčenie alebo obmedzenie náhodných či následných škôd, preto sa vyššie uvedené obmedzenia alebo vylúčenia na vás nemusia vzťahovať. Toto vyhlásenie o záruke vám dáva konkrétne zákonné práva a môžete mať ďalšie práva, ktoré sa v jednotlivých štátoch alebo jurisdikciách môžu líšiť.

9.2 Ochranné známky

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec logo a MiniMACS sú registrované ochranné známky spoločnosti Miltenyi Biotec a/alebo jej pridružených spoločností v rôznych krajinách po celom svete. Všetky ostatné ochranné známky uvedené v tomto dokumente sú majetkom príslušných vlastníkov a používajú sa iba na identifikačné účely.

Miltenyi Biotec

Nemecko/Rakúsko
Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG
Friedrich-Ebert-Straße 68
51429 Bergisch Gladbach
Nemecko
+49 2204 8306-0
+49 2204 85197
macsde@miltenyi.com

USA/Kanada
Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street
Auburn, CA 95602
USA
800 FOR MACS
+1 530 888 8871
+1 877 591 1060
macsus@miltenyi.com

Austrália
Miltenyi Biotec
Australia Pty. Ltd.
Unit 11, 2 Eden Park Drive
Macquarie Park NSW 2113
Austrália
+61 2 8877 7400
+61 2 9889 5044
macsau@miltenyi.com

Benelux
Miltenyi Biotec B.V.
Dellaertweg 9C
2316 WZ Leiden
Holandsko
macsnl@miltenyi.com
Zákaznícky servis v Holandsku
0800 4020120
0800 4020100
Zákaznícky servis v Belgicku
0800 94016
0800 99626
Zákaznícky servis v Luxembursku
800 24971
800 24984

Čína
Miltenyi Biotec Technology &
Trading (Shanghai) Co., Ltd.
Room A401, 4/F
No. 1077, Zhangheng Road
Pudong New Area
201203 Shanghai
P.R. Čína
+86 21 6235 1005
+86 21 6235 0953
macscn@miltenyi.com.cn

Francúzsko
Miltenyi Biotec SAS
10 rue Mercoeur
75011 Paris
Francúzsko
+33 1 56 98 16 16
macsfr@miltenyi.com

Hong Kong
Miltenyi Biotec Hong Kong Ltd.
Unit 301, Lakeside 1
No. 8 Science Park West Avenue
Hong Kong Science Park
Pak Shek Kok, New Territories
Hong Kong
+852 3751 6698
+852 3619 5772
macshk@miltenyi.com.hk

Japonsko
Miltenyi Biotec K.K.
NEX-Eitai Building 5F
16-10 Fuyuki, Koto-ku,
Tokyo 135-0041
Japonsko
+81 3 5646 8910
+81 3 5646 8911
macsjp@miltenyi.com

Kórejská republika
Miltenyi Biotec Korea Co., Ltd.
Donggeuk 7F
562 Nonhyeon-ro
Gangnam-gu
Seoul 06136
Kórejská republika
+82 2 555 1988
+82 2 555 8890
macskr@miltenyi.com

Severské krajiny a Pobaltie
Miltenyi Biotec Norden AB
Medicon Village
Scheeletorget 1
223 81 Lund
Švédsko
macsse@miltenyi.com
Zákaznícky servis vo Švédsku
0200 111 800
+46 280 72 99
Zákaznícky servis v Dánsku
80 20 30 10
+46 46 280 72 99
Zákaznícky servis
Nórsko, Fínsko, Island
a pobaltské krajiny
+46 46 280 72 80
+46 46 280 72 99

Singapur
Miltenyi Biotec Asia Pacific Pte Ltd
438B Alexandra Road, Block B
Alexandra Technopark
#06-01
Singapore 119968
+65 6238 8183
+65 6238 0302
macssg@miltenyi.com

Španielsko
Miltenyi Biotec S.L.
C/Luis Buñuel 2
Ciudad de la Imagen
28223 Pozuelo de Alarcón (Madrid)
Španielsko
+34 91 512 12 90
+34 91 512 12 91
macses@miltenyi.com

Spojené kráľovstvo
Miltenyi Biotec Ltd.
Almac House, Church Lane
Bisley, Surrey GU24 9DR
Spojené kráľovstvo
+44 1483 799 800
+44 1483 799 811
macsuk@miltenyi.com

Švajčiarsko
Miltenyi Biotec Swiss AG
Gibelinstrasse 27
4500 Solothurn
Švajčiarsko
+41 32 623 08 47
+49 2204 85197
macsch@miltenyi.com

Taliansko
Miltenyi Biotec S.r.l.
Via Paolo Nanni Costa, 30
40133 Bologna
Taliansko
+39 051 6 460 411
+39 051 6 460 499
macsit@miltenyi.com

www.miltenyibiotec.com

Spoločnosť Miltenyi Biotec poskytuje produkty a služby po celom svete. Navštívte stránky na adrese **www.miltenyibiotec.com/local** a vyhľadajte najbližšiu pobočku spoločnosti Miltenyi Biotec.

CliniMACS, MACS, MACSmix, logo Miltenyi Biotec a MiniMACS sú registrované ochranné známky alebo ochranné známky spoločnosti Miltenyi Biotec B.V. & Co. KG a/alebo jej afilácií v rôznych krajinách po celom svete. Copyright © 2023 Miltenyi Biotec a/alebo jej pridružené spoločnosti. Všetky práva vyhradené.

210-003-254/01 | Dátum vydania: 2023-11